

DÉBORA PAGLIUSO

**O PAPEL DE APIOSE NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS
ESTRUTURAIS DE *Spirodela polyrhiza***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge

Coorientadora: Dra. Adriana Grandis

São Paulo

2022

DÉBORA PAGLIUSO

**O PAPEL DE APIOSE NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS
ESTRUTURAIS DE *Spirodela polyrhiza***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge

Coorientadora: Dra. Adriana Grandis

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo

2022

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Pagliuso, Débora

O papel de apiose no metabolismo de carboidratos estruturais de *Spirodela polyrhiza* / Débora Pagliuso; orientador Marcos Silveira Buckeridge; coorientadora Adriana Grandis. -- São Paulo, 2022. 188 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Crescimento vegetal. 2. Parede celular. 3. Pectinas. 4. Polissacarídeos. 5. Boro. I. Silveira Buckeridge, Marcos, orientador. II. Grandis, Adriana, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto do Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

FOLHA DE APROVAÇÃO DE BANCA- TESE

Candidato (a): Débora Pagliuso

Título da Tese: O papel de apiose no metabolismo de carboidratos estruturais de *Spirodela polyrhiza*

Orientador (a): Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge

Coorientador (a): Dra. Adriana Grandis

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ___/___/___, considerou

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador (a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador (a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador (a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador (a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador (a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente : Assinatura:

Nome:

Instituição:



ICBUSP

Cidade Universitária 'Armando de Salles Oliveira', Butantã, São Paulo, Sp. Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em pesquisa. Telefone (11) 3091-7732 - e-mail: cep@icbusp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB ne 983/2018 referente ao projeto intitulado: "***O papel de apiose no metabolismo de carboidratos estruturais de Spirodela polyrhiza***" sob a responsabilidade de ***Débora Pagliuso*** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) ***Marcos Silveira Buckeridge***, do Departamento de Biotecnologia, foi analisado pela CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo **CEPSH** — Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei ne 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP ne 466/2012.

São Paulo, 24 de setembro de 2018

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA ICB/USP

Profa. Dra. **Camila Squarzon Dale**
Coordenadora CEPSH ICB/USP

*Á minha família,
e principalmente aos meus pais Edina e Cláudio,
por todos ensinamentos, discernimentos e
a paciência de lidar com meu “gênio” diariamente,
dedico.*

AGRADECIMENTOS

Deixo aqui meus agradecimentos sinceros a todos que contribuíram de forma direta e indireta para o cumprimento deste trabalho:

Aos meus pais, pelo enorme suporte emocional durante todo o processo. A minha mãe Edina, sem muitas vezes entender, aguentar relatos diários de experimentos e explicações intermináveis. E ao meu pai Cláudio, por dar pitacos e fazer eu questionar simplesmente TUDO!

Ao meu orientador Dr. Marcos S. Buckeridge pela oportunidade de trabalho.

A minha co-orientadora (e muito mais) Dra. Adriana Grandis pelas intermináveis discussões, desabafos, projeções, delineamentos e por aguentar minha loucura.

A minha co-orientadora não-oficial Dra. Magdalena Rossi por ter toda a paciência do mundo em me explicar sobre o mundo de transformações de plantas.

A Dra. Marie-Anne von Sluys por todas conversas de corredor e pelas imensas ajudas com os resultados mais estranhos possíveis.

A Dra Eny I.S. Floh pela confiança, provimento de infraestrutura e equipamentos para o cultivo *in vitro*.

Ao Dr. Eric Lam pela disponibilização do material vegetal, verificações ortográficas de inglês e elucidações sobre minhas queridas demônias.

Ao Dr. Robert Martienssen e Evan. C. Ernst pela disponibilização dos dados de sequências de *Lemna minor*.

Ao Kenneth Acosta por todo suporte e questionamentos na busca de ortólogos de *Lemna minor*.

Ao Dr. Marcelo Marques Zerillo pela anotação do genoma da minha querida 9509.

Ao Dr. Bruno Lira pela maior paciência em me ajudar com protocolos de biologia molecular e softwares de filogenia.

A Dra. Paula Cristina Gasperazzo Turrini e ao Henrique Moura pelo auxílio com vetores e bactérias.

A Dra. Helaine Carrer que me recebeu de braços abertos em seu laboratório para realizar processos de transformação e pelos enormes ensinamentos.

Ao Ênio Tiago de Oliveira que teve toda paciência do mundo em elucidar processos de cultura de tecidos e as premissas do preparo para a biobalística.

A MsC. Juliana H. Veríssimo de Oliveira que compartilhou comigo o drama das lentilhas d'água e suas inconsistências.

As técnicas Tatiana C. Silveira Corrêa, Amanda Ferreira Macedo, Silvia Regina Blanco, Viviane Costa e Eglee S. Igarashi pelo amparo e ajuda em momentos de perplexidade.

Ao Prof. Igor Cesarino pelas sugestões.

A todo pessoal do GaTE e do GMP por todo socorro prestado durante as tragédias experimentais e aos momentos de alegria.

Ao Giovanni V. Cerruti por suportar minha convivência por 7 anos e pelos desabafos.

Ao João Pedro de Jesus Pereira pelos passeios no bandeirão e pelo help nas repetições do ensaio do boro.

Ao Dr. Bruno Navarro por todo suporte nas minhas dúvidas, na redação do manuscrito do NDP-açúcares e nas benditas contas de definição de primers constitutivos.

Aos colegas do LAFIECO por deixarem o dia-a-dia mais colorido e divertido.

A minha família que sempre perguntavam: “Como estão suas plantinhas?”, por entenderem minhas escolhas e estarem lá quando necessário.

Ao Instituto de Biociências pelo uso das dependências.

A CAPES pelo fomento à pesquisa a partir da bolsa concedida (processo 88882.377113/2019-1).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Ao INCT do Bioetanol pelo fomento à pesquisa (FAPESP 2014/50884–5 e CNPq 465319/2014–9).

A Pós-Graduação em Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo pela oportunidade, amparo com documentos e pelo fomento da publicação do artigo.

“A experiência nunca falha, apenas nossas opiniões falham, ao esperar da experiência aquilo que ela não é capaz de oferecer.”

- Leonardo da Vinci

RESUMO

PAGLIUSO, D. O papel de apiose no metabolismo de carboidratos estruturais de *Spirodela polyrhiza*. 2022. (188 f.) Tese (Doutorado em Biotecnologia)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

Problemáticas ambientais em escala global, como as mudanças climáticas, têm motivado a busca por formas alternativas de energia. Dentre as novas matrizes destacam-se os biocombustíveis oriundos de materiais celulósicos, principalmente os que exigem poucos insumos agrônômicos e têm processamento favorável, como as lentilhas d'água. Lentilhas d'água são as menores angiospermas aquáticas flutuantes. Essas plantas apresentam crescimento acelerado, resultando em um acúmulo de biomassa até 30 vezes mais rápido que cultivares agrícolas. Esse crescimento acelerado é hipotetizado pela abundância de apiose nas paredes celulares dessas plantas, um açúcar responsável por fixar boro, o qual é um micronutriente essencial para o desenvolvimento das plantas. A parede celular é uma estrutura complexa formada um centro de microfibrilas de celulose em que hemiceluloses e ligninas estão ligadas a essa, e essa estrutura está imersa em uma matriz péctica. Os polissacarídeos de parede celular são constituídos de monossacarídeos que são sintetizados através de nucleotídeos-açúcares. Desta forma, o metabolismo basal de nucleotídeo-açúcares é o ponto de regulação e modulação para as modificações encontradas na parede celular. Pensando nisso, a presente tese teve como objetivo a caracterização funcional de UDP-apiose/UDP-xilose sintase (AXS) em lentilhas d'água, o gene responsável pela síntese do precursor da apiose, UDP-apiose. Para tanto, foram inicialmente identificados e mapeados os genes que codificam as enzimas da via biossintética dos nucleotídeos-açúcares no genoma de *Spirodela polyrhiza* e *Lemna minor*. Logo, a validação e tentativa de determinação de protocolo de cultura de tecidos para as espécies avaliadas foram conduzidas, em que a linhagem de *S. polyrhiza* não respondeu aos tratamentos submetidos para a indução de calos. Sendo assim, as transformações genéticas de silenciamento e superexpressão foram realizadas em sistema de frondes para *S. polyrhiza* e calos para *L. minor*. Os resultados obtidos do silenciamento de *SpAXS* causa redução do dreno da parede celular e incremento de amido, enquanto que a superexpressão leva a poucas alterações no conteúdo de apiose e redução no conteúdo de amido. As evidências são consistentes com a hipótese de que a expressão de *AXS* não está diretamente relacionada ao conteúdo de apiose, sugerindo um controle pós-traducional, ou ainda etapas não elucidadas da transferência de UDP-apiose para os polissacarídeos. Esse controle indireto da expressão também foi visto no experimento do desenvolvimento de *S. polyrhiza* com diferentes concentrações de boro, em que aos 7 dias a expressão de *AXS* aumentou 9 vezes sem que um aumento de apiose na parede celular. O boro interferiu no desenvolvimento de *S. polyrhiza* com alterações na parede celular, especialmente com redução de pectinas, apiose e aumento de galactose, arabinose e glicose o que beneficiou a sacarificação dessa biomassa, a qual seria promissora para a produção de biocombustíveis.

Palavras chave: apiose, carboidratos de parede celular, nucleotídeo-açúcares, lentilhas d'água, bioenergia.

ABSTRACT

PAGLIUSO, D. The role of apiose in *Spirodela polyrhiza* structural carbohydrates metabolism. 2022. (188 f.) Ph. D. thesis (Biotechnology)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

Environmental problems on a global scale, such as climate change, have motivated the search for alternative energies. Among the new matrices, biofuels from cellulosic materials stand out, especially those that require few agronomic inputs and have favorable processing, such as duckweeds. Duckweeds are the smallest floating aquatic angiosperms. The fast-growth capacity is hypothesized by the abundance of apiose in these plant cell walls. Apiose is a sugar responsible for the boron fixation in plants, which is essential for development. The cell wall is a complex structure formed by a cellulose core linked to hemicellulose and lignin that are immersed in pectins. Cell wall polysaccharides are made up of monosaccharides that are synthesized through nucleotide sugars. Thus, the basal metabolism of nucleotide sugars is the regulation and modulation point for alterations within the cell wall. With this in mind, the present thesis aimed the functional characterization of *UDP-apiose/UDP-xylose synthase* (AXS) in duckweed, the gene responsible for the synthesis of the precursor of apiose, UDP-apiose. For this purpose, genes encoding enzymes of the nucleotide sugar biosynthetic pathway were identified and mapped in the genome of *Spirodela polyrhiza* and *Lemna minor*. Then, the validation and attempt to determine tissue culture protocols were performed in two species of duckweeds, of which the *S. polyrhiza* strain didn't answer the treatments for callus induction. Therefore, the genetic transformation of silencing and overexpression was performed in a frond system for *S. polyrhiza* and a callus system for *L. minor*. The results obtained from *SpAXS* silencing caused a reduction in the cell wall content and increased starch, while overexpression led to a small alteration in only apiose content and a reduction in starch. Evidence is consistent with a hypothesis that AXS expression is not directly related to apiose content, suggesting post-transcriptional controls, or even further unknown steps in the transfer of UDP-apiose to polysaccharides. This indirect control of expression was also seen in the experiment of *S. polyrhiza* development with different boron concentrations, in which at 7 days the AXS expression increased 9-fold without an increase of apiose into the cell walls. Boron interfered in the development of *S. polyrhiza* with changes in the cell wall, especially with a reduction in pectins, apiose, and an increase in galactose, arabinose, and glucose. These changes in the *S. polyrhiza* cell walls benefit biomass saccharification, which would be promising for the production of biofuels.

Keywords: apiose, cell wall carbohydrates, nucleotide-sugars, duckweeds, bioenergy.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	17
1.1. Lentilhas d'água.....	17
1.2. Parede celular.....	23
2. CONTEXTUALIZAÇÃO DA TESE	27
3. OBJETIVOS	28
4. REFERÊNCIAS	30
CAPÍTULO I - MAPEAMENTO DO GENOMA E EXPRESSÃO DAS VIAS DO AÇÚCAR DO NUCLEOTÍDEO QUE LEVAM À FORMAÇÃO DA PAREDE CELULAR NA LENTILHA GIGANTE <i>Spirodela polyrhiza</i>	36
1.1. INTRODUÇÃO.....	37
1.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
1.2.1. Material vegetal.....	41
1.2.2. Carboidratos não estruturais.....	41
1.2.3. Carboidratos estruturais.....	42
1.2.4. Predição de genes de <i>Spirodela polyrhiza</i> 9509.....	42
1.2.5. Seleção de alvos da via dos nucleotídeos-açúcares.....	43
1.2.6. Seleção de candidatos a genes de referência.....	44
1.2.7. Desenho de oligonucleotídeos.....	44
1.2.8. Extração de RNA, tratamento com DNase e síntese de cDNA.....	45
1.2.9. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	45
1.2.10. Análise qrt-PCR.....	46
1.2.11. Consistência e validação dos genes de referência.....	46
1.3. RESULTADOS.....	47
1.3.1. Carboidratos estruturais e não estruturais.....	47
1.3.2. Mapeamento de ortólogos nos cromossomos de <i>S. polyrhiza</i>	48
1.3.3. Eficiência dos oligonucleotídeos e amplificação qRT-PCR.....	51
1.3.4. Níveis de expressão de nucleotídeos-açúcares.....	51
1.4. DISCUSSÃO.....	54

1.5. CONCLUSÃO.....	63
1.6. REFERÊNCIAS.....	63
CAPÍTULO II – MAPEAMENTO DO GENOMA E DE NUCLEOTÍDEOS-AÇÚCARES NA FORMAÇÃO DA PAREDE CELULAR DE <i>Lemna minor</i> 8627.....	75
2.1. INTRODUÇÃO.....	76
2.2. OBJETIVOS.....	77
2.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	78
2.3.1. Levantamento de genes de nucleotídeos-açúcares.....	78
2.3.2. Identificação de possíveis parálogos.....	78
2.3.3. Desenho de iniciadores.....	79
2.3.4. Material vegetal.....	79
2.3.5. Extração de RNA, tratamento com DNase e síntese de cDNA.....	80
2.3.6. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	80
2.4. RESULTADOS.....	81
2.5. DISCUSSÃO.....	82
2.6. CONCLUSÃO.....	85
2.7. REFERÊNCIAS.....	85
CAPÍTULO III – CULTURA DE TECIDOS DE <i>S. polyrhiza</i> e <i>L. minor</i>.....	88
3.1. INTRODUÇÃO.....	89
3.2. OBJETIVOS.....	90
3.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	90
3.3.1. Material vegetal.....	90
3.3.2. Indução de calos de <i>S. polyrhiza</i>	90
3.3.3. Indução, propagação e regeneração de calos de <i>L. minor</i>	91
3.4. RESULTADOS.....	92
3.5. DISCUSSÃO.....	93
3.6. CONCLUSÃO.....	94
3.7. REFERÊNCIAS.....	95

CAPÍTULO IV – TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE LENTILHAS D’ÁGUA E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DEO GENE AXS.....	97
4.1. INTRODUÇÃO.....	98
4.2. OBJETIVOS.....	101
4.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	101
4.3.1. Material vegetal e processamento.....	101
4.3.2. Análise de gene alvo.....	102
4.3.3. Desenho do RNA de interferência (RNAi)	102
4.3.4. Desenho de SpAXS para superexpressão.....	103
4.3.5. Extração de RNA, síntese de cDNA e amplificação de genes selecionados.....	103
4.3.6. Obtenção das construções de silenciamento e superexpressão.....	104
4.3.7. Transformação em <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	107
4.3.8. Teste de toxicidade para seleção de transformantes.....	107
4.3.9. Transformação em lentilhas d’água.....	108
4.3.10. Transformação por biobalística.....	109
4.3.10.1. <i>Quantificação da atividade da enzima β-GLUCURONIDASE (GUS) em tabaco</i>	110
4.3.11. Genotipagem e expressão gênica dos transgênicos.....	110
4.3.12. Análises bioquímicas de carboidratos estruturais e não estruturais dos transgênicos.....	111
4.3.13. Análise estatística.....	112
4.4. RESULTADOS.....	113
4.4.1. UDP-APIOSE/UDP-XILOSE SINTASE (AXS)	113
4.4.2. Obtenção das construções para transformação.....	114
4.4.3. Transformação de frondes de <i>S. polyrhiza</i> via <i>A. tumefaciens</i>	115
4.4.4. Transformação de <i>L. minor</i> por calos via <i>A. tumefaciens</i>	121
4.4.5. Transformação de calos de <i>L. minor</i> via biobalística.....	124
4.5. DISCUSSÃO.....	125
4.5.1. Técnicas de transformação e as respostas das lentilhas d’água.....	126
4.5.2. AXS e o desenvolvimento de lentilhas d’água.....	129
4.6. CONCLUSÃO.....	132
4.7. REFERÊNCIAS.....	132

CAPÍTULO V – EFEITO DO BORO NO DESENVIMENTO E NA PAREDE CELULAR DE <i>S. polyrhiza</i>	139
5.1. INTRODUÇÃO	140
5.2. OBJETIVOS	141
5.3. MATERIAL E MÉTODOS	141
5.3.1. Material vegetal.....	141
5.3.2. Quantificação de boro.....	142
5.3.3. Taxa de crescimento.....	142
5.3.4. Extração e análise de açúcares solúveis.....	142
5.3.5. Extração e quantificação de amido.....	143
5.3.6. Hidrólise e análise de monossacarídeos de parede celular.....	143
5.3.7. Determinação de ácidos urônicos.....	144
5.3.8. Extração de RNA, tratamento com DNase e síntese de cDNA.....	144
5.3.9. Análise de expressão relativa por qRT-PCR.....	145
5.3.10. Análise de dados.....	146
5.4. RESULTADOS	146
5.4.1. O boro aumenta o crescimento de <i>Spirodela polyrhiza</i> , mas causa toxicidade em concentrações elevadas.....	146
5.4.2. Assimilação de boro estimula o crescimento das plantas.....	148
5.4.3. Carboidratos não estruturais em resposta ao aumento de boro.....	149
5.4.4. Boro modula apiose e xilose na parede celular impactando na capacidade de sacarificação.....	150
5.5. DISCUSSÃO	154
5.6. CONCLUSÃO	157
5.7. REFERÊNCIAS	158
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	162
APÊNDICES	166
APÊNDICE A – MATERIAL SUPLEMENTAR DO CAPÍTULO I	167
APÊNDICE B – MATERIAL SUPLEMENTAR DO CAPÍTULO II	172

APÊNDICE C – MATERIAL SUPLEMENTAR DO CAPÍTULO IV.....	179
APÊNDICE E – MATERIAL SUPLEMENTAR DO CAPÍTULO V.....	181
APÊNDICE E – DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O PERÍODO DE DOUTORADO.....	182

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Lentilhas d'água

As lentilhas d'água são as menores monocotiledôneas aquáticas flutuantes com capacidade de florir (LANDOLT, 1992; ZIEGLER et al., 2014). Essas plantas pertencem à família Lemnaceae, as quais são agrupadas em duas subfamílias: Lemnoideae (*Spirodela*, *Landoltia* e *Lemna*) e Wolffioideae (*Wolffiella* e *Wolffia*), juntas contemplando 38 espécies (LES et al., 2002).

Dentre as lentilhas d'água, as espécies *Spirodela polyrhiza* e *Lemna minor* (membros da família Lemnoideae) são amplamente estudadas e podem ser consideradas modelos de estudo devido às suas características morfológicas e evolutivas (LANDOLT, 1992; VAN HOECK et al., 2015). *L. minor* foi fundamental para a compreensão do fotoperíodo durante a floração e na biossíntese de auxina e assimilação de enxofre (BRUCE; MALKIN, 1991; CEDERGREEN; MADSEN, 2002; MAENG; KHUDAIRI, 1973; MOON; STOMP, 1997).

A lentilha d'água gigante, *S. polyrhiza*, morfológicamente apresenta 2-5 frondes assimétricas em forma obovada a circular, podendo ser arredondadas ou pontiagudas no ápice (LANDOLT, 1992; PLOTT, 2002) (**Figura 1A**). As frondes, ainda, apresentam 7-21 nervuras e na parte ventral da fronde descendem 2 a 21 raízes (LANDOLT, 1992; PLOTT, 2002). As frondes de *S. polyrhiza* podem ser separadas em duas porções: distal e proximal (**Figura 1B**). A porção distal compreende no corpo da fronde enquanto que a porção proximal compreende no tecido meristemático (LACOR, 1970). Na porção proximal existem quatro estruturas importantes: dois bolsos reprodutivos, o ponto nodal e o estolão (**Figura 1B**). Os bolsos reprodutivos são responsáveis pela geração de novas frondes, o ponto nodal das raízes e o estolão conectam a fronde mãe à filha (1ª e 2ª geração) (**Figura 1B**) (LACOR, 1970).

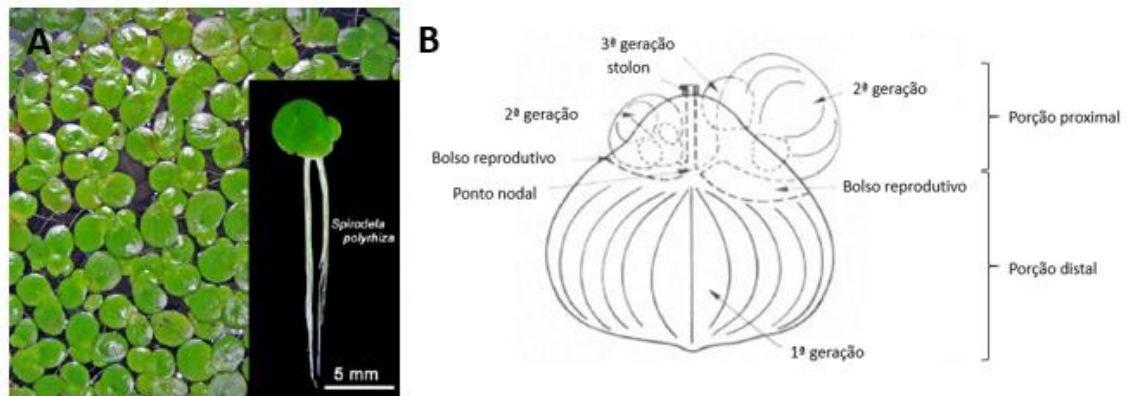


Figura 1. Características morfológicas de *Spirodela polyrhiza*. **A.** Esquema apresentando a planta *Spirodela polyrhiza* em cultivo e destacando um indivíduo isoladamente. **B.** Representação esquemática da estrutura e de novas formações da fronde.

Fonte: Adaptado de Kutschera e Niklas (2015); Lacor (1970).

Por outro lado, a espécie *L. minor* é uma das 13 espécies de seu gênero a qual apresenta frondes achatadas em grupos de 2-10 com três nervuras (**Figura 2**) (LANDOLT, 1975; LES et al., 2002). Na parte ventral da fronde descende apenas uma raiz, a qual pode alcançar até 15 cm, não apresentando traqueídes (LANDOLT, 1975). Assim como em *Spirodela*, essas plantas apresentam dois bolsos laterais reprodutivos (semelhantes ao apresentado na **Figura 1B**) (LANDOLT, 1975).

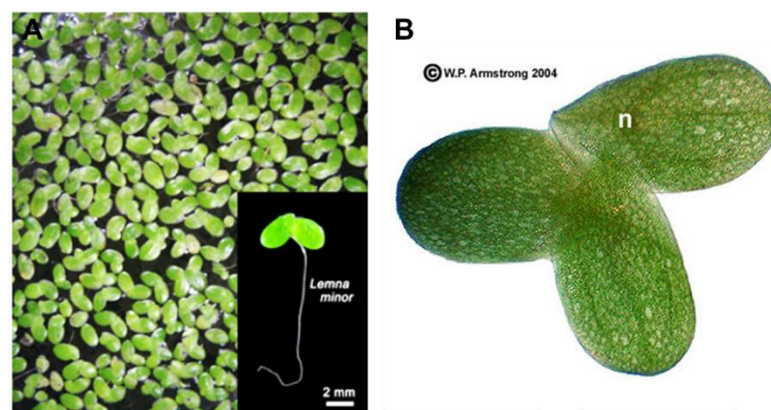


Figura 2. Características morfológicas de *Lemna minor*. **A.** Esquema apresentando a planta *Lemna minor* em cultivo e destacando um indivíduo isoladamente. **B.** Frondes de *Lemna minor* destacando suas nervuras.

Fonte: Adaptado de Kutschera e Niklas (2015); Wang e Armstrong (2004).

Filogeneticamente, *S. polyrhiza* é a espécie ancestral das lentilhas d'água (LANDOLT, 1992), a qual apresenta um genoma diplóide de 158 Mb completamente sequenciado e organizado em mapas cromossômicos de alta fidelidade (MICHAEL et al., 2017). Os demais gêneros das lentilhas d'água

aumentaram a ploidia ($2n=20-126$) e expandiram seu genoma em até três vezes (WANG; KERSTETTER; MICHAEL, 2011). O genoma da linhagem 9509 de *S. polyrhiza* apresenta variações e níveis de heterozigose baixos, e apenas 18.507 genes codificantes de proteínas (MICHAEL et al., 2017). As proteínas preditas, quando comparadas com *Arabidopsis thaliana*, *Brachypodium distachyon*, *Musa balbisiana*, *Sorghum bicolor*, *Oryza sativa* e *Elaeis guineensis*, são apenas 0,01% específicas, sendo o nível de metilação de DNA o mais baixo já testado em plantas (~9%) (MICHAEL et al., 2017). Quanto à estrutura dos 20 cromossomos da espécie, há uma redução em seu tamanho pela eliminação de genes codificantes de proteínas não essenciais, elementos de transposição, rDNA e LTRs (do inglês, *Long Terminal Repeats*) (MICHAEL et al., 2017). Enquanto que o *draft* do genoma de *L. minor 5500* apresenta 472 Mb ($2n=40$) com 22.382 genes codificantes de proteínas, sendo 12,9% específicas e 61,5% de sequências repetidas (VAN HOECK et al., 2015). Porém, esse genoma não está disponível para a comunidade científica. Diferentes ecótipos de *Lemna* apresentam uma variação no conteúdo genômico de 323-760 Mbp (WANG; KERSTETTER; MICHAEL, 2011) que podem acarretar em divergências de conteúdo de sequências repetidas e poliploidia (ADAMS; WENDEL, 2005; AN et al., 2018; SEGRAVES, 2017; VAN DE PEER; MIZRACHI; MARCHAL, 2017). Outras duas linhagens de *Lemna* foram sequenciadas pelo laboratório do Dr. Robert Martienssen do *Cold Spring Harbor Laboratory* (USA). O ecótipo *L. gibba 7742^a* apresenta um genoma de 450 Mpb com 21.830 proteínas codificantes, enquanto *L. minor 8627^{1c}* apresenta um genoma de 800 Mpb (AN et al., 2018; YANG et al., 2021). Pesquisadores propõem o aumento do tamanho do genoma de *L. minor 8627* de cinco vezes em relação a *S. polyrhiza* (158 Mp) e quase duas vezes em relação a *L. minor 5500* (472 Mb) e *L. gibba* (450 Mb) decorrente da duplicação completa de seu genoma antes do processo de segregação (AN et al., 2018).

Devido ao enorme potencial bioeconômico das lentilhas d'água, a seleção de características desejáveis, ou modificações específicas, ou ainda a inserção de genes exógenos predispõe aplicações em diversos setores. Métodos eficientes de transformação tanto estável quanto transiente foram desenvolvidos para algumas espécies de lentilhas d'água (YANG et al., 2020). Dentre os distintos métodos de transformação, o método indireto utilizando *Agrobacterium*

tumefaciens é a principal forma de modificação genética em lentilhas d'água (YANG et al., 2020). As bactérias do gênero *Agrobacterium* são encontradas na microbiota do solo e quatro espécies são fitopatógenos causadores da doença galha de coroa (PĂCURAR et al., 2011). O mecanismo de infecção da galha de coroa por essas bactérias faz com que um segmento de DNA exógeno da bactéria, denominado de T-DNA, seja incorporado no vegetal através de uma lesão. A planta infectada irá apresentar uma descompensação dos hormônios auxina e citocinina, levando à formação de tumores, como também o metabolismo secundário do vegetal passará a sintetizar opinas, fonte de carbono e nitrogênio para a *Agrobacterium* (PĂCURAR et al., 2011). A estrutura do T-DNA pôde ser alterada por biologia molecular com a capacidade de infectar a planta, não resultando na formação de tumores (HOLSTERS et al., 1978; KLEE; HORSCH; ROGERS, 1987). Para tanto, duas bordas de 25-28 pb são necessárias para flanquear o DNA a ser transferido (KLEE; HORSCH; ROGERS, 1987; LACROIX et al., 2006). Porém, esse T-DNA atua somente como veículo de um gene alvo, necessitando outros mecanismos da bactéria para poder ser introduzido na planta, ou seja, a região de virulência contida no plasmídeo do T-DNA é requerida para que a transferência e integração seja possível (HOLSTERS et al., 1978; KLEE; HORSCH; ROGERS, 1987; LACROIX et al., 2006; PĂCURAR et al., 2011).

Transformações mediadas por *A. tumefaciens* resultaram em transformantes estáveis para *Lemna minor*, *Lemna gibba*, *Spirodela punctata*, *Spirodela oligorrhiza*, e *Wolffia arrhiza* e transformações transientes para *S. polyrrhiza* e *Wolffia columbiana* (YANG et al., 2020). Alguns fatores são importantes em transformações mediadas por *A. tumefaciens*, como a linhagem desarmada (livre de genes oncogênicos), densidade, condições de co-cultivo e concentrações de agentes de seleção (YANG et al., 2021, 2020). Entretanto, há indícios que a capacidade estável de transformação está relacionada ao explante submetido à transformação. As transformações de lentilhas d'água têm sido conduzidas em dois sistemas: cultura de tecidos (1) e frondes (2). Na sua grande maioria o método em calos ou calos nodulares resultam em transformações estáveis do DNA exógeno (CHHABRA et al., 2011; EDELMAN et al., 2007; GASDASKA; SPENCER; DICKEY, 2003; HEENATIGALA et al., 2018; KHVATKOV et al., 2015a; RIVAL et al., 2008; STOMP; RAJBHANDARI,

2000; VUNSH et al., 2007; YAMAMOTO et al., 2001; YANG et al., 2018b), enquanto sistemas que empregam frondes como explantes tendem a resultar em transformações transientes (BOEHM et al., 2001; HEENATIGALA et al., 2018; KHVATKOV et al., 2015b, 2015a; KRUSE et al., 2002; THU et al., 2015; YANG et al., 2018b). Embora Ko et al. (2011) e Yang et al. (2018) foram capazes de obter lentilhas d'água transformadas com formas estáveis pelo sistema de frondes. Ko et al. (2011) coletou uma linhagem de *Lemna minor* de Daejeon (Coréia do Sul) que foi capaz de expressar com estabilidade o antígeno do vírus da diarreia epidêmica suína apenas com submissão de frondes lesionadas em culturas de *A. tumefasciens* carreando o construto. Essas plantas passaram por uma pressão seletiva por três meses para garantia da estabilização do transgene. Já YANG et al., (2018a) determinou um sistema de transformação por frondes em *L. minor* ZH0055 que foi capaz de gerar transformações estáveis. Frondes mãe foram selecionadas e mantidas em solução aquosa de sacarose e glutamina a qual foi submetida a infiltração a vácuo por 10 minutos com cultura de *A. tumefasciens* suplementada com o composto fenólico, acetoseringona (YANG et al., 2018a). No caso da determinação de um sistema de frondes por Yang et al. (2018), o mesmo foi comparado com o sistema convencional de transformação por cultura de tecidos, o qual leva pelo menos seis meses ou mais para obtenção e validação do transgênico. Além disso, a taxa de eficiência de transformação pelo sistema de frondes é 2% enquanto que dos calos é o dobro, mas deve-se levar em conta que a indução de calos tem uma taxa de eficiência de 92% dos quais apenas 30% regeneram (YANG et al., 2018a).

A eficiência da transformação em lentilhas d'água pode ser considerada baixa, variando de 0.1-12% (BOEHM et al., 2001; CHHABRA et al., 2011; HEENATIGALA et al., 2018; KHVATKOV et al., 2015b, 2015a; THU et al., 2015; YANG et al., 2018a, 2018b). Essa eficiência está diretamente relacionada a concentração do plasmídeo, tempo de incubação e temperatura dos protocolos de transformação (YANG et al., 2020). Sendo assim protocolos precisam ser otimizados, como também a resposta dos ecótipos precisa ser levada em consideração.

As lentilhas d'água apresentam um crescimento acelerado, sendo cerca de 30 vezes mais rápidas que os demais cultivares agrícolas (APPENROTH; BORISJUK; LAM, 2013; LENG, 1999; ZIEGLER et al., 2014). Esse crescimento

atípico permite um acúmulo de biomassa em 88-117 t.ha⁻¹.ano⁻¹ que podem ser destinadas a diversas aplicações industriais e biotecnológicas (ZIEGLER et al., 2014). De modo geral a biomassa das lentilhas d'água é capaz de dobrar em até 16-96 horas (APPENROTH; BORISJUK; LAM, 2013; LENG, 1999; ZIEGLER et al., 2014), sendo que *S. polyrhiza* possui uma das maiores taxas de crescimento (PAGLIUSO et al., 2018; ZIEGLER et al., 2014). A reprodução ocorre de forma assexuada, por clones, levando a uma geração geneticamente homogênea de plantas (NAUMANN; EBERIUS; APPENROTH, 2007). A reprodução clonal pode ser problemática para uso desta planta como modelo decorrente da manutenção contínua dos cultivos.

O crescimento vegetativo se deve ao ciclo dessas plantas em gerar novas frondes e senescer (ASHBY; WANGERMANN, 1949; WANGERMANN; ASHBY, 1950). O período de senescência ocorre quando o tempo de vida da fronde filha atinge metade dos dias da fronde de sua progenitora, representando metade da capacidade de sobrevivência (LENG, 1999; WANGERMANN; ASHBY, 1950). Portanto, há um processo de crescimento cíclico que funciona da seguinte forma: uma fronde progenitora apresenta uma expectativa de vida máxima de aproximadamente 40 dias e suas frondes filhas apresentam um tempo da vida reduzido para 33 dias (**Figura 3**). Conforme a reprodução clonal ocorre, este tempo de vida é gradualmente reduzido, até que a fronde mais tardia atinja um máximo de 10 dias de vida. Neste momento, ocorre uma reprogramação de forma que a sua descendente passa a ter tamanho e tempo de vida aumentados novamente, reiniciando o ciclo de crescimento (**Figura 3**) (ASHBY; WANGERMANN, 1949; WANGERMANN; ASHBY, 1950). Pouco é conhecido sobre a reprogramação e a plasticidade do ciclo vegetativo de crescimento das lentilhas d'água.

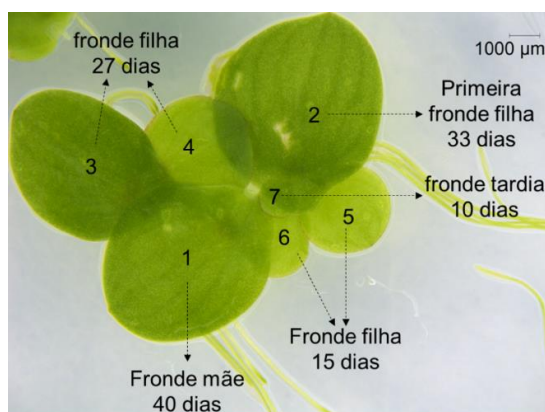


Figura 3. Processo de replicação e senescência das lentilhas d'água a partir da redução do tempo de vida e tamanho celular em *Spirodela polyrhiza*. Números representam a sequência cronológica de nascimento das frondes em um indivíduo.

O crescimento acelerado por parte dessas plantas está hipoteticamente associado à capacidade de retenção de boro por essas plantas a partir do açúcar apiose, constituinte da parede celular (PAGLIUSO et al., 2018).

1.2. Parede celular

As paredes celulares são estruturas formadas por polissacarídeos, compostos fenólicos e proteínas, com funções mecânica, protetiva e sinalizadora (COSGROVE, 2005; KALLURI; KELLER, 2010). Essas estruturas contêm um domínio de celulose interligado à hemiceluloses imerso em um domínio de pectinas (CARPITA; GIBEAUT, 1993; COSGROVE, 2005; O'NEILL; YORK, 2003). A celulose é um polímero linear composto de monômeros de glicose unidos por ligações β -1,4 (KALLURI; KELLER, 2010; LIEPMAN; CAVALIER, 2012; MALEKI; MOHAMMADI; JI, 2016). As hemiceluloses são polímeros ramificados compostos principalmente por cadeias de hexoses (glicose, manose e galactose) e pentoses (xilose e arabinose) que são unidas por ligações β -1,4 (SCHELLER; ULVSKOV, 2010). Cadeias lineares desses açúcares podem apresentar diversas ramificações formando as hemiceluloses: xiloglucanos, xilanos, mananos e β -glucanos. Os xiloglucanos são formados por uma cadeia principal de glicose ramificadas com xilose, galactose e fucose, enquanto que os xilanos são compostos de uma cadeia principal de xilose com ramificações a formar glucuronoxilanos (ácido glucurônico), arabinoxilano (arabinose e xilose) e glucuronoarabinoxilano (ácido glucurônico, xilose e arabinose) (PAULY et al., 2013; SCHELLER; ULVSKOV, 2010). Já os mananos são formados de cadeias principais de manose com ramificações a formar glucomamano (manose e/ou glicose), galactomananos (galactose e manose), galactoglucomanos (galactose, glicose e manose). E os β -glucanos são constituídos apenas de monômeros de glicose unidos por ligações β -1,3 e β -1,4 (PAULY et al., 2013; SCHELLER; ULVSKOV, 2010). As pectinas são polissacarídeos formados de ácido galacturônicos ligados O-1 e O-4 que podem apresentar ramificações e substituições distintas a formar cinco classes: homogalacturonanos, ramnogalacturonanos do tipo I e do tipo II, xilogalacturonanos e apiogalacturonanos. (MOHNEN, 2008). Os

homogalacturonanos (HG) são as pectinas mais abundantes formadas de uma cadeia linear de α -1,4-ácido galacturônico, podendo ser metilesterificado C-6 e O-2 ou O-3 acetilados (O'NEILL; ALBERSHEIM; DARVILL, 1990). Essa classe pécica pode apresentar interrupções na sua cadeia central por ramnoses, as quais podem ser ramificadas com cadeias de polímeros neutros (galactanos e/ou arabinanos), como é o caso dos ramnogalacturonanos do tipo I (RGI). Os RG-I apresentam um esqueleto de dissacarídeos de [α -D-ácido galacturônico-1,2- α -L-ramnose-1,4] (MOHNEN, 2008). Esses representam 20-35% do conteúdo pécico das plantas (MOHNEN, 2008). Já os ramnogalacturonanos do tipo II representam 10% das pectinas e são formados de 12 açúcares distintos e mais de 20 ligações, fazendo desta a estrutura mais complexa da parede celular (MOHNEN, 2008). As outras duas classes de pectinas, são mais simples e pouco frequentes, apresentando ramificação da cadeia de ácido galacturônico por apiose na posição O-2 ou O-3, apiogalacturonanos, ou por xilose na posição O-3, xilogalacturonanos (MOHNEN, 2008).

As paredes celulares são classificadas em primárias e secundárias. As primárias são expansíveis e 90% de seu peso seco compreende em polissacarídeos (BUCKERIDGE *et al.*, 2010). Além disso, as paredes primárias são subdivididas em três tipos de acordo com a proporções de seus domínios e da principal hemicelulose presente. As paredes do tipo I são características das eucodicotiledôneas e compostas por microfibrilas de celulose ligadas à xiloglucanos com proporções equivalentes entre celulose, hemiceluloses e pectinas (CARPITA; GIBEAUT, 1993). Já a do tipo II é característica das *Poaceae* (gramíneas) em que o arabinoxilano é a principal hemicelulose e os teores de pectinas e xiloglucanos são reduzidos (CARPITA; GIBEAUT, 1993; JARVIS; FORSYTH; DUNCAN, 1988). O tipo III é comum nas pteridófitas, onde mananos são as principais hemiceluloses e a porção de pectinas é pequena (SILVA *et al.*, 2011). Por fim, as paredes secundárias são aquelas que se formam a partir da parede primária, pela deposição de celulose, hemicelulose e/ou lignina (POGORELKO *et al.*, 2013).

A síntese da parede celular envolve a construção, montagem, transporte e organização de seus polímeros. Os carboidratos assimilados pela fotossíntese são exportados como triose-fosfato para o citosol, onde passam por uma série de vias metabólicas que envolvem o precursor UDP-glicose para a síntese de

nucleotídeo-açúcares (ZEEMAN, 2015). Estes compostos, por sua vez, funcionam como substratos na biossíntese dos polissacarídeos pécticos e hemicelulósicos no complexo de Golgi, e da celulose na membrana plasmática (NEBENFÜHR; STAEHELIN, 2001; VERBANČIČ et al., 2017). Na medida que os polissacarídeos hemicelulósicos e pécticos são terminados no Golgi, as vesículas da Trans-Golgi-Net secretam os polímeros para a superfície celular (OKEKEOGBU et al., 2019), culminando com um arranjo complexo e organizado denominado de código glicômico (BUCKERIDGE, 2017).

No caso das lentilhas d'água, o código glicômico segue o padrão encontrado nas paredes primárias do tipo I, que são constituídas de uma matriz celulose-hemiceluloses com predominância de xiloglucanos, imersa em pectinas (CARPITA; GIBEAUT, 1993), sendo que xilanos e glucomanos também são encontrados (SOWINSKI et al., 2019). Uma característica peculiar das paredes de lentilhas d'água é que apresentam alto conteúdo de pectinas (até 33%) (CHANDA; BHADURI; SARDAR, 1991; HART; KINDEL, 1970) junto com a presença abundante de apiose em sua composição (AVCI; PEÑA; O'NEILL, 2018). O conteúdo de apiose está relacionado com o processo evolutivo que levou ao aparecimento dessas plantas. Tanto é que as espécies da subfamília Lemnoideae tendem a apresentar maiores teores de apiogalacturonanos, enquanto as de Wolffioideae apresentam alta proporção de xilogalacturonanos (AVCI; PEÑA; O'NEILL, 2018). A ocorrência destes dois tipos de pectinas parece estar relacionada ao crescimento dessas plantas (PAGLIUSO et al., 2018). Uma possível explicação para esta distinção favorável no crescimento é a capacidade que os apiogalacturonanos possuem de reter íons. A presença de apiose é responsável pela complexação com o micronutriente essencial boro que está envolvido no desenvolvimento da planta (MATOH, 1997). Para as lentilhas d'água, este é um fator crucial, uma vez que a concentração disponível de boro em ambientes aquáticos chega a ser 1000 vezes menor do que em ambientes terrestres (CAMACHO-CRISTÓBAL; REXACH; GONZÁLEZ-FONTES, 2008; MATOH, 1997; MATOH; KOBAYASHI, 1998). Além disso, a apiose está envolvida na estrutura da parede celular pela manutenção das ramificações das cadeias laterais dos ramnogalacturonanos do tipo II (RGII) (PIČMANOVÁ; MØLLER, 2016). Estes polímeros podem modificar a porosidade da parede celular, bem como participarem dos sistemas de defesa contra patógenos,

sinalização celular, crioproteção e proteção contra danos oxidativos (PIČMANOVÁ; MØLLER, 2016).

Considerando a correlação do apiogalacturonano com o crescimento de espécies de Lemnoideae, é de grande interesse aprofundar o conhecimento sobre estas vias de forma a obter provas de que, de fato, alterações neste polissacarídeo são determinantes para o crescimento.

A enzima bifuncional UDP-apiose/UDP-xilose sintase responsável pela síntese de apiose e xilose é codificada pelo gene *AXS*. Em *A. thaliana* há duas cópias gênicas, *AtAXS1* e *AtAXS2*, enquanto que *S. polyrhiza* e *L. minor* apresenta cópia única. Um estudo realizado por Ahn *et al.* (2006) avaliou a depleção de UDP-apiose/UDP-xilose sintase em *Nicotiana benthamiana*. Neste estudo, foi observado que houve alterações no conteúdo de amido e das cadeias laterais de RG-II, mas não no restante da parede celular. Porém, o desenvolvimento do tabaco foi comprometido com redução de crescimento, lise celular e de organelas e amarelamento das folhas (AHN *et al.*, 2006). Mais recentemente, foi visto que o gene *AXS* em *A. thaliana* é essencial para o desenvolvimento, de tal forma que seus duplos mutantes são letais (ZHAO *et al.*, 2020). Porém *N. benthamiana* e *A. thaliana* não apresentam apiogalacturonanos, portanto seria interessante avaliar o efeito sobre a síntese de açúcares em uma lentilha d'água que tem mais de 33% de sua parede composta por pectinas ricas em apiose. Interessantemente, quando espécimes de *S. polyrhiza* entram em dormência, as paredes celulares são remodeladas, reduzindo o teor de apiose e ocorre um acúmulo de amido (LONGLAND; FRY; TREWAVAS, 1989). Essa modificação na composição dos carboidratos junto com a redução de aerênquima fazem com que as plantas afundem e sobrevivam em regiões onde há o congelamento dos rios e lagos (APPENROTH; TELLER; HORN, 1996; OLÁH; HEPP; MÉSZÁROS, 2016; PERRY; BYRNE, 1969; SMART; TREWAVAS, 1983; WANG; WU; MESSING, 2014)

Hipoteticamente, a abundância de apiose na parede das lentilhas d'água permite o armazenamento de elevados teores de boro (devido à presença de apiogalacturonanos). A maior disponibilidade de boro resulta na estabilização das membranas das paredes celulares, bem como, colabora com a captação de íons e a expansão de células recém divididas, a qual resulta em uma elevada taxa de crescimento (AHMAD *et al.*, 2008).

Neste contexto, o presente trabalho visou responder as seguintes questões: (1) Qual a importância da apiose na parede celular, no metabolismo de carboidratos e no crescimento de *S. polyrhiza*? (2) Qual a relação do conteúdo de carboidratos ricos em apiose com o gene *AXS*?

2. Contextualização da tese e organização dos capítulos

As lentilhas d'água podem ser apontadas como alternativas na produção de biomassa para bioenergia, uma vez que possuem crescimento acelerado. Além disto, seu cultivo pode ser feito ao mesmo tempo em que ocorre a remediação de águas. Condições de manejo e cultivo simples permitem compreender aspectos básicos da fisiologia relacionados à produção de alimentos, cosméticos, biorefinaria e demais aplicações biotecnológicas.

No âmbito bioenergético, quanto maior a taxa de crescimento e acúmulo de carboidratos fermentáveis, maior será a viabilidade na produção de biomassa. Portanto, compreender os mecanismos que levam às altas taxas de crescimento e suas relações com a síntese de apiose, uma pentose pouco fermentável, permitirá otimizar os carboidratos de lentilhas d'água com finalidades de aplicação na biorrefinaria. Pelo fato do principal polissacarídeo da parede celular das lentilhas d'água ser composto por apiogalacturonano que não é fermentável por organismos convencionais usados na indústria, sua abundância pode ser vista como empecilho. Do ponto de vista químico, suas propriedades podem ser empregadas nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos, com alto valor agregado.

Nesse contexto, a presente tese tem como temática o estudo do gene *UDP-apiose/UDP-xilose sintase (AXS)* a partir de uma abordagem sistêmica do desenvolvimento da planta com redução e aumento de sua expressão, bem como sua regulação dependente da disponibilidade de boro. A **Figura 4** apresenta um fluxograma contendo as principais estratégias que foram empregadas para o desenvolvimento desta tese que levam a compreender a função do gene *AXS1* e seus impactos em lentilhas d'água.

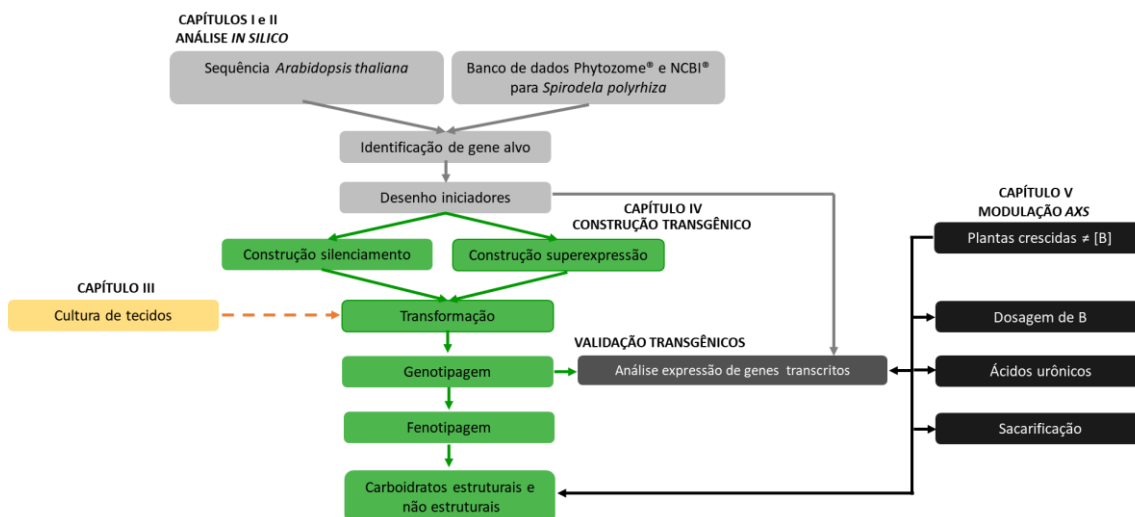


Figura 4. Fluxograma das principais etapas que constituem esta tese. Os blocos: análise *in silico* (cinza claro), construção de transgênicos e validação dos transgênicos (verde), modulação de AXS (preto) estão apresentados em caixa alta e as etapas que cabem a cada bloco estão representadas pela mesma cor. Para a transformação é necessária uma etapa extra de cultura de tecidos (amarelo). Os transgênicos obtidos foram então submetidos à genotipagem e expressão gênica (cinza escuro) e fenotipagem (verde) a qual contempla bioquímica de açúcares (carboidratos estruturais e não estruturais).

A primeira etapa do presente trabalho consistiu no levantamento gênico da via de síntese dos nucleotídeos açúcares. As etapas subsequentes consistiram na concepção, construção do cassete e obtenção de transgênicos tanto para silenciamento quanto superexpressão do gene *SpAXS1* (Figura 4), com a finalidade de relacionar ao efeito da pectina rica em apiose com o crescimento das lentilhas d'água.

Para o silenciamento foi escolhida a estratégia de RNA de interferência (RNAi) que consiste no uso de pequenos RNA dupla fita respectivos a um segmento da porção codificante de *SpAXS1*, o qual será reconhecido pelo sistema de reparo e, conseqüentemente, o gene transcrito será degradado. O construto para o silenciamento empregou o vetor pK7GWIWG2(I) utilizando o promotor 35S e resistência para canamicina. Já para a superexpressão foi obtida uma construção no vetor pFAST-R02 com a porção codificante (CDS) do gene *SpAXS1* sob controle do promotor 35S e resistência ao herbicida Basta. Estas etapas foram conduzidas em colaboração com a Profa. Dra. Maria Magdalena Rossi do laboratório de Genética Molecular de Plantas (IB/USP).

A construção do cassete e transformação foi confirmada por sequenciamento em colaboração com o grupo da Profa. Dra. Marie-Anne Van Sluys do laboratório de Genômica e Elementos de Transposição (IB/USP).

Para a realização das transformações em lentilhas d'água se fez necessário o conhecimento prévio da reprodução do ciclo da espécie em cultura de tecidos, isto é a obtenção de células totipotentes e regeneração das plantas. Esse processo é fundamental para a garantia de plantas transformadas em um sistema homogêneo e da estabilidade das inserções gênicas. Essa etapa foi realizada em colaboração com a Profa. Dra. Eny Iochet Segal Floh no laboratório de Biologia Celular (IB/USP) e Profa. Dra. Helaine Carrer no laboratório de Genômica e Biologia Molecular de Plantas (ESALQ/USP).

A regulação gênica da via dos nucleotídeos açúcares, bem como a verificação da expressão do transgene foi avaliada pela comparação dos níveis de expressão dos transcritos a partir de qRT-PCR. Os transgênicos ainda foram analisados em relação ao conteúdo de carboidratos não-estruturais e estruturais a fim de verificar os fenótipos resultantes da alteração na via dos nucleotídeos-açúcares.

Ainda, para avaliar o papel de apiose na captação de boro e suas consequências para o desenvolvimento de lentilhas d'água, *S. polyrhiza* foi submetida ao crescimento em diferentes concentrações de boro e foram avaliadas taxas de crescimento, acúmulo de biomassa, conteúdo de boro, concentração de pectinas, composição de carboidratos estruturais e não estruturais e a capacidade de sacarificação do material vegetal.

3. OBJETIVOS

Essa tese teve como objetivo geral a caracterização funcional de *UDP-apiose/xilose sintase* de *S. polyrhiza*, *SpAXS* em lentilhas d'água. Para o cumprimento foi proposta as metas:

Capítulo I e II

- Identificar os genes que codificam as enzimas da via biossintética dos nucleotídeos-açúcares no genoma de *S. polyrhiza* e *L. minor*

Capítulo III

- Determinar protocolo de cultura de tecidos para *S. polyrhiza* e *L. minor*.

Capítulo IV

- Obter construções para o silenciamento e a superexpressão do gene *SpAXS1*.
- Obter linhagens silenciadas e sobreexpressantes de *SpAXS1*.
- Caracterizar as linhagens transgênicas genotipicamente e fenotipicamente.

Capítulo V

- Analisar o desenvolvimento de *S. polyrhiza* crescida em diferentes concentrações de ácido bórico.
- Analisar a expressão gênica de *AXS* e genes de interesse de *S. polyrhiza* crescida em diferentes concentrações de ácido bórico.
- Caracterizar e correlacionar a composição química de açúcares estruturais e não estruturais de *S. polyrhiza* crescidas em diferentes concentrações de ácido bórico, bem como avaliar a expressão de genes da via dos nucleotídeos-açúcares.

4. REFERÊNCIAS

- ADAMS, K. L.; WENDEL, J. F. Polyploidy and genome evolution in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, p. 135–141, 2005.
- AHMAD, W. et al. Role of boron in plant growth: a review. **J. Agric. Res**, v. 47, n. 3, p. 329–338, 2008.
- AHN, J. W. et al. Depletion of UDP-D-apiose/UDP-D-xylose synthases results in rhamnogalacturonan-II deficiency, cell wall thickening, and cell death in higher plants. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 19, p. 13708–13716, 12 maio 2006.
- AN, D. et al. Genomes and transcriptomes of duckweeds. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, n. JUN, p. 1–11, 2018.
- APPENROTH, K. J.; BORISJUK, N.; LAM, E. Telling duckweed apart: Genotyping technologies for the Lemnaceae. **Chinese Journal of Applied and Environmental Biology**, v. 19, n. 1, p. 1–10, 2013.
- APPENROTH, K. J.; TELLER, S.; HORN, M. Photophysiology of turion formation and germination in *Spirodela polyrhiza*. **Biologia plantarum**, v. 38, n. January 1995, p. 95–106, 1996.
- ASHBY, E.; WANGERMANN, E. **Senescence and rejuvenation in Lemna minor** [14] **Nature**, 30 jul. 1949. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18135930>>. Acesso em: 10 abr. 2020
- AVCI, U.; PEÑA, M. J.; O'NEILL, M. A. Changes in the abundance of cell wall apiogalacturonan and xylogalacturonan and conservation of

rhamnogalacturonan II structure during the diversification of the Lemnoideae. **Planta**, v. 247, n. 4, p. 953–971, 1 abr. 2018.

BOEHM, R. et al. A transient transformation system for duckweed (*Wolffia columbiana*) using *Agrobacterium*-mediated gene transfer. **Journal of Applied Botany**, v. 75, n. 3–4, p. 107–111, 2001.

BRUCE, B. D.; MALKIN, R. Biosynthesis of the chloroplast cytochrome b6 f complex: Studies in a photosynthetic mutant of *Lemna*. **Plant Cell**, v. 3, n. 2, p. 203–212, 1991.

BUCKERIDGE, M. S. The evolution of the Glycomic Codes of extracellular matrices. **BioSystems**, v. 164, p. 112–120, 1 fev. 2017.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D.; SOUZA, A. P. As rotas para o etanol celulósico no Brasil. In: Luís Augusto Barbosa Cortez (Org.) Bioetanol da cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2010, p.365-380.

CAMACHO-CRISTÓBAL, J. J.; REXACH, J.; GONZÁLEZ-FONTES, A. Boron in plants: Deficiency and toxicity. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, n. 10, p. 1247–1255, 2008.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. 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**, v. 3, n. 1, p. 1–30, 1993.

CEDERGREEN, N.; MADSEN, T. V. Nitrogen uptake by the floating macrophyte *Lemna minor*. **New Phytologist**, v. 155, n. 2, p. 285–292, 1 ago. 2002.

CHANDA, S.; BHADURI, S. K.; SARDAR, D. Chemical characterization of pressed fibrous residues of four aquatic weeds. **Aquatic Botany**, v. 42, n. 1, p. 81–85, 1991.

CHHABRA, G. et al. Genetic transformation of Indian isolate of *Lemna minor* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and recovery of transgenic plants. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 17, n. 2, p. 129–136, abr. 2011.

COSGROVE, D. J. Growth of the plant cell wall. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 11, p. 850–861, 2005.

EDELMAN, I. M. et al. (12) United States Patent. v. 316, n. 12, p. 1194–1199, 2007.

GASDASKA, J.; SPENCER, D.; DICKEY, L. Advantages of Therapeutic Protein Production in the Aquatic Plant *Lemna*. **BioProcessing Journal**, v. 2, n. 2, p. 49–56, 30 abr. 2003.

HART, D. A.; KINDEL, P. K. Isolation and partial characterization of apiogalacturonans from the cell wall of *Lemna minor*. **The Biochemical journal**, v. 116, n. 4, p. 569–579, fev. 1970.

HEENATIGALA, P. P. M. et al. Development of efficient protocols for stable and transient gene transformation for *Wolffia Globosa* using *Agrobacterium*. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, n. JUN, p. 1–10, 2018.

HOLSTERS, M. et al. **Transfection and Transformation of Agrobacterium tumefaciens**. [s.l: s.n.].

JARVIS, M. C.; FORSYTH, W.; DUNCAN, H. J. A survey of the pectic content of nonlignified monocot cell walls. **Plant physiology**, v. 88, n. 2, p. 309–314, 1 out. 1988.

KALLURI, U. C.; KELLER, M. Bioenergy research: a new paradigm in multidisciplinary research. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 7, n. 51, p. 1391–1401, 6 out. 2010.

KHVATKOV, P. et al. Transformation of *Wolffia arrhiza* (L.) Horkel ex Wimm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 123, n. 2, p. 299–307, 2015a.

KHVATKOV, P. et al. Callus induction and regeneration in *Wolffia arrhiza* (L.) Horkel ex Wimm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 120, n. 1, p. 263–273, 2015b.

KLEE, H.; HORSCH, R.; ROGERS, S. *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation and its Further Applications to Plant Biology. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 38, n. 1, p. 467–486, 28 jun. 1987.

KO, S. M. et al. Expression of the protective antigen for PEDV in transgenic duckweed, *Lemna minor*. **Horticulture Environment and Biotechnology**, v. 52, n. 5, p. 511–515, 2011.

KRUSE, C. et al. Transient transformation of *Wolffia columbiana* by particle bombardment. **Aquatic Botany**, v. 72, n. 2, p. 175–181, 2002.

KUTSCHERA, U.; NIKLAS, K. J. of an enigmatic group of angiosperms Darwin-Wallace Demons: Survival of the fastest in populations of duckweeds and the evolutionary history. **Plant Biology**, v. 17, n. s1, p. 24–32, 2015.

LACOR, M. A. M. SOME PHYSIOLOGICAL AND MORPHOGENETIC ASPECTS OF FLOWERING OF *SPIRODELA POLYRHIZA* (L.) SCHLEIDEN. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 19, n. 1, p. 53–60, 1 fev. 1970.

LACROIX, B. et al. **Will you let me use your nucleus? How Agrobacterium gets its T-DNA expressed in the host plant cell** *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* Can J Physiol Pharmacol, , mar. 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16902581/>>. Acesso em: 16 mar. 2021

LANDOLT, E. Morphological differentiation and geographical distribution of the *Lemna gibba-lemna minor* group. **Aquatic Botany**, v. 1, n. C, p. 345–363, 1975.

LANDOLT, E. **Lemnaceae Duckweed Family** *Journal of the Arizona-Nevada academy of science*, 1992.

LENG, R. A. **Duckweed: A tiny aquatic plant with enormous potential for agriculture and environment** FAO, , 1999.

LES, D. H. D. et al. Phylogeny and Systematics of Lemnaceae, the Duckweed Family. **Systematic Botany**, v. 27, n. 2, p. 221–240, 1 abr. 2002.

LIEPMAN, A. H.; CAVALIER, D. M. The CELLULOSE SYNTHASE-LIKE A and CELLULOSE SYNTHASE-LIKE C families: recent advances and future

- perspectives. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, n. May, p. 1–7, 2012.
- LONGLAND, J. M.; FRY, S. C.; TREWAVAS, A. J. Developmental Control of Apiogalacturonan Biosynthesis and UDP-Apiose Production in a Duckweed. **Plant physiology**, v. 90, n. 3, p. 972–976, jul. 1989.
- MAENG, J.; KHUDAIRI, A. K. Studies on the Flowering Mechanism in Lemna. I. Amino Acid Changes During Flower Induction. **Physiologia Plantarum**, v. 28, n. 2, p. 264–270, 1 abr. 1973.
- MALEKI, S. S.; MOHAMMADI, K.; JI, K. Characterization of Cellulose Synthesis in Plant Cells. **The Scientific World Journal**, v. 2016, p. 1–8, 2016.
- MATOH, T. Boron in plant cell walls. **Plant and Soil**, v. 193, n. 1, p. 59–70, 1997.
- MATOH, T.; KOBAYASHI, M. Boron and calcium, essential inorganic constituents of pectic polysaccharides in higher plant cell walls. **Journal of Plant Research**, v. 111, n. 1, p. 179–190, 1998.
- MICHAEL, T. P. et al. Comprehensive definition of genome features in *Spirodela polyrhiza* by high-depth physical mapping and short-read DNA sequencing strategies. **Plant Journal**, v. 89, n. 3, p. 617–635, 2017.
- MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 3, p. 266–277, jun. 2008.
- MOON, H.; STOMP, A. Effects of medium components and light on callus induction, growth, and frond regeneration in *Lemna gibba* (duckweed). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, n. January, p. 20–25, 1997.
- NAUMANN, B.; EBERIUS, M.; APPENROTH, K. J. Growth rate based dose-response relationships and EC-values of ten heavy metals using the duckweed growth inhibition test (ISO 20079) with *Lemna minor* L. clone St. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, n. 12, p. 1656–1664, 2007.
- NEBENFÜHR, A.; STAEHELIN, L. A. **Mobile factories: Golgi dynamics in plant cells** **TRENDS in Plant Science**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://plants.trends.com/1360>>. Acesso em: 10 abr. 2020.
- O'NEILL, M. A.; YORK, W. S. The Composition and Structure of Plant Primary Cell Walls. **Annual Plant Reviews online**, v. 8, p. 1–54, 19 abr. 2003.
- O'NEILL, M.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. The Pectic Polysaccharides of Primary Cell Walls. In: [s.l.] Academic Press, 1990. v. 2p. 415–441.
- OKEKEOGBU, I. O. et al. Glycome and proteome components of golgi membranes are common between two angiosperms with distinct cell-wall structures. **Plant Cell**, v. 31, n. 5, p. 1094–1112, 2019.
- OLÁH, V.; HEPP, A.; MÉSZÁROS, I. Assessment of Giant Duckweed (*Spirodela polyrhiza* L. Schleiden) Turions as Model Objects in Ecotoxicological Applications. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 96, n. 5, p. 596–601, 2016.
- PĂCURAR, D. I. et al. **Agrobacterium tumefaciens: From crown gall tumors to genetic transformation** **Physiological and Molecular Plant Pathology** Academic Press, , 1 ago. 2011.

- PAGLIUSO, D. et al. Correlation of apiose levels and growth rates in duckweeds. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, n. JUL, p. 1–10, 2018.
- PAULY, M. et al. Hemicellulose biosynthesis. **Planta**, v. 238, n. 4, p. 627–642, 2013.
- PERRY, T. O.; BYRNE, O. R. Turion Induction in *Spirodela polyrrhiza* by Abscisic Acid. **Plant Physiology**, v. 44, n. 5, p. 784–785, 1969.
- PIČMANOVÁ, M.; MØLLER, B. L. Apiose: One of nature's witty games. **Glycobiology**, v. 26, n. 5, p. 430–442, 2016.
- POGORELKO, G. et al. Cell wall integrity: Targeted post-synthetic modifications to reveal its role in plant growth and defense against pathogens. **Plant Signaling & Behavior**, v. 8, n. 9, p. e25435, set. 2013.
- RIVAL, S. et al. *Spirodela* (duckweed) as an alternative production system for pharmaceuticals: A case study, aprotinin. **Transgenic Research**, v. 17, n. 4, p. 503–513, 2008.
- SHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 263–289, 2010.
- SEGRAVES, K. A. **The effects of genome duplications in a community context** *New Phytologist* Blackwell Publishing Ltd, , 1 jul. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28418074/>>. Acesso em: 11 mar. 2021
- SILVA, G. B. et al. Cell wall polysaccharides from fern leaves: Evidence for a mannan-rich Type III cell wall in *Adiantum raddianum*. **Phytochemistry**, v. 72, n. 18, p. 2352–2360, dez. 2011.
- SMART, C.; TREWAVAS, A. Abscisic-acid-induced turion formation in *Spirodela polyrrhiza* L. I. Production and development of the turion. **Plant, Cell & Environment**, v. 3, p. 507–514, 1983.
- SOWINSKI, E. E. et al. Linkage structure of cell-wall polysaccharides from three duckweed species. **Carbohydrate Polymers**, v. 223, n. July, p. 115119, 2019.
- STOMP, A.; RAJBHANDARI, N. **Duckweed genetically engineered**, 2000.
- THU, P. T. L. et al. Regeneration and Transformation of Gene Encoding the Hemagglutinin Antigen of the H5N1 Virus in Frond of Duckweed (*Spirodela polyrrhiza* L.). **Journal of Agricultural Studies**, v. 3, n. 1, p. 48, 2015.
- VAN DE PEER, Y.; MIZRACHI, E.; MARCHAL, K. The evolutionary significance of polyploidy. **Nature Reviews Genetics**, v. 18, n. 7, p. 411–424, 2017.
- VAN HOECK, A. et al. The first draft genome of the aquatic model plant *Lemna minor* opens the route for future stress physiology research and biotechnological applications. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 188, 2015.
- VERBANČIČ, J. et al. Carbon supply and the regulation of cell wall synthesis. **Molecular Plant**, v. 11, n. January, p. 75–94, 2017.
- VUNSH, R. et al. High expression of transgene protein in *Spirodela*. **Plant Cell Reports**, v. 26, n. 9, p. 1511–1519, 2007.

WANG, W.; KERSTETTER, R. A.; MICHAEL, T. P. Evolution of Genome Size in Duckweeds (Lemnaceae). **Journal of Botany**, v. 2011, p. 1–9, 2011.

WANG, W.; WU, Y.; MESSING, J. RNA-Seq transcriptome analysis of Spirodela dormancy without reproduction. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 60, jan. 2014.

WANGERMANN, E.; ASHBY, E. A DISCUSSION ON MORPHOGENESIS: MORPHOGENESIS IN LEMNA MINOR. **Proceedings of the Linnean Society of London**, v. 162, n. 1, p. 10–13, 1 out. 1950.

YAMAMOTO, Y. T. et al. Genetic Transformation of Duckweed Lemna gibba and Lemna minor Published by: Society for In Vitro Biology Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/4293473> . Your use of the JSTOR archive indicates your acceptance of JSTOR ' s Terms and Conditions of Use. **In Vitro**, v. 37, n. 3, p. 349–353, 2001.

YANG, G. L. et al. Frond transformation system mediated by Agrobacterium tumefaciens for Lemna minor. **Plant Molecular Biology**, v. 98, n. 4–5, p. 319–331, 2018a.

YANG, G. L. et al. Research progress of a potential bioreactor: Duckweed. **Biomolecules**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2021.

YANG, J. et al. A protocol for efficient callus induction and stable transformation of Spirodela polyrhiza (L.) Schleiden using Agrobacterium tumefaciens. **Aquatic Botany**, v. 151, n. August, p. 80–86, 2018b.

YANG, J. et al. Transformation Development in Duckweeds. In: [s.l.: s.n.]. p. 143–155.

ZHAO, X. et al. UDP-Api/UDP-Xyl synthases affect plant development by controlling the content of UDP-Api to regulate the RG-II-borate complex. **The Plant Journal**, p. 1–16, 2020.

ZEEMAN, S.C. Carbohydrate metabolism. In: Biochemistry and molecular biology of plants. Buchanan, B.; Gruissem, W.; Jones, R. (Eds). American Society of Plant Physiologists, p. 567-610, 2015.

ZIEGLER, P. et al. Relative in vitro growth rates of duckweeds (Lemnaceae) - the most rapidly growing higher plants. **Plant biology (Stuttgart, Germany)**, v. 17, n. Fao 2013, p. 1–9, 2014.

CAPÍTULO I

MAPEAMENTO DO GENOMA E EXPRESSÃO GÊNICA DAS VIAS DO AÇÚCAR DO NUCLEOTÍDEO QUE LEVAM À FORMAÇÃO DA PAREDE CELULAR NA LENTILHA GIGANTE *Spirodela polyrhiza*

Colaboradores: Dr. Eric Lam, Dr. Marcelo M. Zerillo e Dr. Bruno V. Navarro

Artigo publicado no periódico *Bioenergy Research*

PAGLIUSO, D.; NAVARRO, B.V.; GRANDIS, A.; ZERILLO, M.M.; LAM, E.; BUCKERIDGE, M.S. NDP-Sugar Pathways Overview of *Spirodela polyrhiza* and Their Relevance for Bioenergy and Biorefinery. **Bioenergy Research**, 2022. <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10355-4>

1.1. INTRODUÇÃO

Todas as células vegetais são circundadas por paredes celulares, uma estrutura codificada de polissacarídeos, proteínas e compostos fenólicos (BUCKERIDGE, 2018). As paredes são estruturas complexas que podem ser classificadas como primárias e secundárias. As paredes celulares secundárias são polímeros covalentemente ligados, formadas principalmente por celulose, hemiceluloses e lignina, que conferem resistência e força ao tecido (GIBEAUT e CARPITA, 1994; HIMMEL, 2009; POGORELKO et al., 2013). Por outro lado, as paredes primárias são expansíveis, consistindo em 90% de seu peso seco em polissacarídeos que são arranjados com um centro de celulose interligados por hemiceluloses imersas em uma matriz péctica (POPPER e FRY 2004; O'NEILL e YORK 2003; BUCKERIDGE 2010; CARPITA e GIBEAUT 1993). Os componentes primários da parede celular mantêm as propriedades mecânicas e funcionais das células durante o crescimento e desenvolvimento das plantas (SOMERVILLE et al., 2004).

As paredes primárias são subdivididas em três tipos de acordo com a composição das hemiceluloses e as proporções de pectina, hemicelulose-celulose e proteínas (CARPITA e GIBEAUT 1993). As paredes celulares do tipo I são encontradas em eudicotiledôneas e monocotiledôneas não comelinóides, com xiloglucanos como hemicelulose principal e proporções semelhantes de pectinas, hemiceluloses e celulose (CARPITA e GIBEAUT 1993). As paredes do tipo II são características de gramíneas, com arabinoxilano, β -glucano e baixo teor de pectina (CARPITA e GIBEAUT 1993). Alternativamente, o tipo III é encontrado em samambaias e pteridófitas, sendo os mananos a principal hemicelulose e as pectinas são reduzidas (SILVA et al., 2011).

Nas plantas, além da resistência mecânica e proteção celular, a parede celular é responsável por promover a adesão celular, delimitando o tamanho e o volume das células. As paredes regulam a condução interna de água e solutos, como também determinam a pressão de turgor e agem como fonte de moléculas de sinalização (MCQUEEN-MASON e COSGROVE, 1994; BURTON et al., 2010; GILBERT, 2010; KALLURI E KELLER, 2010; COSGROVE, 2018). Essa estrutura de polissacarídeos criptografada exibe um código glicômico, cujo entendimento tem potencial para elucidar novos mecanismos associados à fisiologia e criar um nicho para sua aplicação (BUCKERIDGE, 2018).

A parede celular é uma das fontes mais significativas de biomassa, que disponibiliza açúcares para matérias-primas e aplicações industriais, como produtos farmacêuticos, cosmetologia e insumos alimentares (WALDRON et al., 2003; SCHÜRCH et al., 2008; BURTON e FINCHER, 2014; VERBANČIČ et al., 2017). Além disso, as paredes celulares são um dos principais drenos de carbono fixado fotossinteticamente em que o principal produto, triose-fosfato, quando exportado do cloroplasto para o citosol, está envolvido na síntese de açúcares solúveis (glicose e frutose), oligossacarídeos solúveis (sacarose e rafinose), açúcares álcoois (inositol, sorbitol e manitol) e os polímeros da parede através da via UDP-glicose (CHAPIN, SCHULZE E MOONEY, 1990; HOCH, RICHTER e KÖRNER, 2003; QUENTIN et al., 2015; VERBANČIČ et al., 2017). Alternativamente, a triose-fosfato pode ser mantida nos cloroplastos (estroma) e usada como substrato para a síntese do amido pela via ADP-glicose, atuando no armazenamento de carbono transitório (SMITH e STITT, 2007). O amido transitório é degradado durante a noite para suprir a demanda energética das plantas e manter os processos metabólicos (SMITH e STITT, 2007; ZEEMAN et al., 2007; SMITH et al., 2012).

Para a síntese da parede, a triose-fosfato enviada para o citosol é condensada em hexoses-fosfato, que irá gerar o substrato para a via de nucleotídeos-açúcares (VERBANČIČ et al., 2017). Este substrato, UDP-glicose, é sintetizado por UDP-glicose-pirofosforilase (UGP, EC 2.7.7.9), sacarose sintase (SUSY, EC 2.4.1.13) e invertase (INV, EC 3.2.1.26) (JANG et al., 1997; STURM e TANG, 1999; KOCH, 2004; VERBANČIČ et al., 2017; HENRY CHRISTOPHER e VAN DEN ENDE, 2018) (**Figura 1.1**). Os nucleotídeos-açúcares são doadores de monossacarídeos altamente energéticos, que contêm um monossacarídeo ligado a uma molécula de nucleosídeo que formará os polímeros polissacarídeos (KLECZKOWSKI et al., 2010). A biossíntese de polissacarídeos envolve o rearranjo dos monossacarídeos por várias glicosiltransferases no complexo de Golgi (SEIFERT, 2004), que serão posteriormente exportados para a membrana plasmática por vesículas (PAULY et al., 2013).

A biossíntese de celulose difere das pectinas e hemiceluloses por sua localização de síntese (SOMERVILLE, 2006). A síntese da celulose ocorre na membrana plasmática por um complexo de seis rosetas compostas por celulosas

sintases (CESA; EC 2.4.1.12), usando UDP-glicose para formar cadeias de β -1,4-D-glicose (SOMERVILLE, 2006; CARPITA, 2011). UDP-glicose também é o precursor de UDP-ramnose (UDP-Ram), UDP-galactose (UDP-Gal) e UDP-glucuronato (UDP-GlcA), portanto, este está envolvido tanto na síntese de hemicelulose quanto na de pectinas (BAR-PELED e O' NEILL, 2011). Os únicos nucleotídeos-açúcares que não são derivados da UDP-glicose são a GDP-manose (GDP-Man) e a GDP-fucose (GDP-Fuc) (SEIFERT, 2004), os quais são sintetizados a partir da frutose-6-fosfato e fazem parte da hemicelulose manano, da ramificação lateral do xiloglucano e de pectinas (**Figura 1.1**).

Normalmente, a parede celular é conservada entre as espécies mesmo com pequenas modificações em diferentes tecidos (DE SOUZA et al., 2013; HOUSTON et al., 2016). Recentemente, foi visto que a lentilha-d'água tem notável plasticidade em suas paredes celulares (PAGLIUSO et al., 2018). Portanto, esta planta é um modelo interessante para avaliar a distribuição de carbono, sua dinâmica de parede celular e a correlação com o desenvolvimento. As lentilhas-d'água são as menores plantas aquáticas e como espécie monocotiledônea, suas paredes primárias são do tipo I, com grande proporção de pectinas, açúcares fermentáveis e lignina reduzida (LANDOLT, 1992; ZHAO et al., 2014; PAGLIUSO et al., 2020). Essas plantas exibem uma parede celular única com apiogalacturonanos como o principal constituinte (LONGLAND, FRY E TREWAVAS 1989). A composição química incomum das paredes celulares da lentilha-d'água torna-as interessantes para a produção de bioenergia, como o etanol (SOWINSKI et al. 2019; GE et al. 2012; SODA et al. 2015; PAGLIUSO et al., 2020). Além disso, as propriedades dos apiogalacturonanos, o tornam adequado para uso como adjuvante (POPOV et al. 2006), ou como preparação cosmética e dermatológica (FILBRY et al., 2007). Ainda, o crescimento rápido e a capacidade de remediação de água das lentilhas d'águas fazem desta uma matéria-prima sustentável (HILLMAN e CULLEY Jr. 1978; ORON et al. 1985; ZIRSCHKY e REED 1988; KÖRNER, VERMAAT e VEENSTRA 2003; CESCHIN, CRESCENZI e IANNELLI 2020).

Para aprimorar as aplicações potenciais e aumentar o conhecimento sobre a parede celular da lentilha-d'água, o objetivo deste capítulo foi avaliar as vias dos nucleotídeos-açúcares em *Spirodela polyrhiza*, e correlacionar os genes, transcritos e caracterização química dos precursores de polissacarídeos.

Abreviaturas: glc (glicose), ram (ramnose), gal (galactose), glcA (ácido glucurônico), xil (xilose), api (apiose), galA (ácido galacturônico), fru (frutose), man (manose), e fuc (fucose).

Adaptações de Alonso et al. (2010), Bar-Peled, O'Neill (2011), Verbančič et al. (2017) vias metabólicas KEGG 00051 (metabolismo de frutose e manose), 00052 (metabolismo de galactose), 00500 (metabolismo de amido e sacarose), 00520 (metabolismo de amino açúcar e açúcar nucleotídeo).

1.2. MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1. Material vegetal

As linhagens 9509 e 7498 de *S. polyrhiza*, originários da Alemanha (Lotschen, Stradtroda) e dos EUA (Carolina do Norte, Durham), respectivamente, foram adquiridos da *Rutgers Duckweed Stock Cooperative* (RDSC). As plantas foram cultivadas axenicamente em 250 mL de meio ½ Schenck-Hildebrandt (Sigma-Aldrich®) suplementado com 0,5% de sacarose e mantidas a 25 °C, com fotoperíodo de 16 h luz / 8 h escuro com 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de radiação fotossintética ativa (PAR).

1.2.2. Carboidratos não estruturais

As plantas foram coletadas após 10-15 dias de cultivo, liofilizadas e moídas em GenoGrinder2010 (Spex®). Um grama de cada amostra moída foi extraído 4 vezes com 25 mL de etanol 80% (v/v) a 80 °C por 20 min (DE SOUZA et al., 2013). Os sobrenadantes contendo açúcares solúveis e outros compostos solúveis foram recuperados, secos a vácuo (ThermoScientific® Savant SC 250 EXP) e ressuspendidos em 1 mL de água e 1 mL de clorofórmio. O resíduo (Resíduo Insolúvel em Álcool-AIR) foi seco a 40 °C e armazenado. Os açúcares solúveis foram analisados por cromatografia de troca aniônica de alto eficiência com detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) em um sistema Dionex® (ICS 5.000), usando coluna CarboPac PA1 eluída com 150 μM de hidróxido de sódio em uma corrida isocrática de 27 min (PAGLIUSO et al., 2018). O AIR foi submetido à extração de amido a partir de digestões enzimáticas com 120 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ α -amilase (E.C. 3.2.1.1) e 30 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ amiloglucosidase (E.C. 3.2.1.3) à 75 °C e 50 °C, respectivamente por 1h (AMARAL et al., 2007). A porção solúvel correspondente ao amido hidrolisado, o qual foi analisada em ensaio colorimétrico pela oxidação das glicoses livres e quantificado a partir de uma curva padrão de glicose 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ sob leitura em espectrofotômetro a 490 nm.

O precipitado após a extração do amido corresponde a parede celular.

1.2.3. Carboidratos estruturais

As paredes celulares foram submetidas a diversas extrações sequenciais e exaustivas para solubilizar as diferentes classes de polissacarídeos (DE SOUZA et al., 2013). Primeiro, o material foi extraído três vezes com 25 mL de oxalato de amônio 0,5 M (pH 7,0) a 80 °C por 1 h cada com agitação contínua para extração das pectinas. Os sobrenadantes foram recuperados por centrifugação, e os resíduos da parede celular foram extraídos com 25 mL de 3% (p/v) de clorito de sódio em 0,3% (v/v) de ácido acético para remoção de lignina (CARPITA, 1984). Os sobrenadantes também foram recuperados, e as hemiceluloses dos resíduos da parede celular de clorito de sódio foram extraídas três vezes com 25 mL cada de NaOH 0,1, 1 e 4 M suplementado com 3 mg.mL⁻¹ com borohidreto de sódio em temperatura ambiente por 1 h. Todos os sobrenadantes e o resíduo foram recuperados, neutralizados, dialisados e liofilizados. O balanço de massa e o rendimento do fracionamento foram calculados gravimetricamente.

Para quantificar os monossacarídeos não celulósicos presentes na parede celular, 5 mg de cada fração de parede obtida foram hidrolisadas com 1 mL ácido trifluoroacético (TFA) 2 M por 1 h à 100 °C. Os monossacarídeos foram recuperados por centrifugação, condensados, ressuspensos em água MiliQ e filtrados a 0,22 µm (Merk Millipore®). Para a análise da celulose foi realizada uma hidrólise da fração resíduo em ácido sulfúrico 72% á 40°C por 45 min, seguida da diluição para 4% e aquecimento á 100°C por 1:30h. Os monossacarídeos foram analisados em cromatografia de troca iônica de alta eficiência com detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD) em coluna CarboPac SA10 (sistema ICS 5.000, Dionex-Thermo®) eluída com água e 0,8% hidróxido de sódio (1 mL.min⁻¹) com detecção pela adição de eluente pós-coluna 200 mM NaOH (0,5 mL.min⁻¹).

1.2.4. Predição de genes de *Spirodela polyrhiza* 9509

A anotação do genoma de *S. polyrhiza* 9509 não está disponível em bandos de dados públicos, para tanto a predição de genes de suas vinte

sequências cromossômicas (acesso de montagem GenBank GCA_001981405.1, loci CP019093.1 - CP019112.1) foi realizada através da ferramenta Augustus (versão 3.3.2) (STANKE e MORGENSTERN, 2005) com os parâmetros padrão e treinados no conjunto de dados *A. thaliana*. Os genes previstos associados ao metabolismo do açúcar foram validados em análises posteriores, conforme serão descritos nos itens a seguir.

1.2.5. Seleção de alvos da via dos nucleotídeos-açúcares

Com base em informações de metabolismos de amino e nucleotídeos-açúcares disponíveis na via da Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEGG) (map00520) e dados de Verbančič *et al.* (2017), foi estabelecido uma via que descreve as enzimas, genes-alvo e produtos de açúcares relacionados ao metabolismo da parede celular (**Figura 1.1**). As sequências de genes relacionados e proteínas previstas de *A. thaliana* foram usadas como *query* em uma pesquisa de similaridade de sequência (ALTSCHUL *et al.*, 1990) contra os genomas de *S. polyrhiza* 9509 e 7498 (**Apêndice 1.1**). A comparação entre os genomas foi realizada usando a ferramenta tBlastN (E-value > e^{-10}) no banco disponível na plataforma Phytozome v12.1.6 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>), ou usando BlastP local contra o nosso banco de dados de proteínas previstas do genoma 9509. Sequências com cobertura $\geq 70\%$ e similaridade $\geq 80\%$ foram recuperadas e consideradas ortólogos (**Apêndice 1.2, 1.3 e 1.4**). As sequências de proteínas homólogas obtidas foram anotadas e classificadas usando HMMER Scan (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/>) (**Apêndices 1.5, 1.6 e 1.7**). Alinhamentos múltiplos foram realizados usando o Programa Clustal Omega (Bioedit®) para identificar possíveis íntrons e regiões conservadas, e as últimas foram selecionadas para desenho de oligonucleotídeos. A distribuição física entre os 20 cromossomos foi determinada com base em dados recuperados do Phytozome®, e o ideograma cromossômico dos genes da via dos nucleotídeos-açúcares avaliado foi projetado pelo software da ferramenta PhenoGram (<https://ritchielab.org/software/phenogram-downloads>) (WOLFE *et al.*, 2013).

Os genes recuperados do genoma 9509 foram, ainda, comparados com o banco de dados de Sequência de Referência (RefSeq) (PRUITT *et al.*, 2005) do NCBI por BlastX (valor E > e^{-10}) e com o banco de dados InterPro (APWEILER *et al.*, 2001) para a pesquisa de domínios funcionais com famílias de proteínas

associadas ao metabolismo de açúcares.

1.2.6. Seleção de candidatos à genes de referência

Treze genes de referência foram selecionados como candidatos a normalizadores: *proteína ribossômica 60S L18A-A (60S)*, *proteína relacionada à actina (ARP7)*, *ciclofilina (CYP)*, *fator de alongamento 1- α (EF1)*, *fator de iniciação translacional 4B (ELF4B)*, *F proteína da família-box (FBOX)*, *proteína fosfatase 2A (PP2A)*, *subunidade D1 (PSAB)*, *proteína ribossômica S24 (S24)*, *cadeia de tubulina α 3 / α 5 (TUA)*, *enzima de conjugação de Ubiquitina (UBQ9)*, *Ubiquitina 7 (UBQ7)* e *subunidade metiltransferase NEP 1 (18S) de RNA ribossomal pequeno (BRUNNER, YAKOVLEV e STRAUSS 2004; ISKANDAR et al. 2004; CZECHOWSKI et al. 2005; EXPÓSITO-RODRÍGUEZ et al. 2008; CRUZ et al. 2009; HU et al. . 2009; ARTICO et al. 2010; NARSAI et al. 2010; MAFRA et al. 2012; DE VEGA-BARTOL et al. 2013; PERINI et al. 2014; ELBL et al. 2015; WANG et al. 2016) (Apêndice 1.8)*. O genoma anotado de *S. polyrhiza* (7498) foi analisado usando *Blastn* (NCBI®) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), no qual as sequências de *A. thaliana* e *Lemna minor* foram usados como *queries* (Apêndice 1.9).

1.2.7. Desenho de oligonucleotídeos

Todos os iniciadores, tanto para os genes dos nucleotídeos-açúcares de parede e amido quanto para os genes de referência, foram desenhados com a ferramenta *Oligonucleotídeos-Blast®* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/oligonucleotídeos-blast/>) de acordo com os seguintes parâmetros: $57\text{ }^{\circ}\text{C} \leq T_m$ (iniciador) $\leq 63\text{ }^{\circ}\text{C}$; $30\% \leq \text{CG} \leq 80\%$; $18\text{ pb} \leq \text{tamanho do iniciador} \leq 27\text{ pb}$; $100\text{ pb} \leq \text{tamanho amplicon} \leq 350\text{ pb}$; $0^{\circ}\text{C} \leq T_m$ do amplicon $\leq 85^{\circ}\text{C}$. Os iniciadores desenhados foram analisados em relação à sua estrutura pelo programa *Oligo Analyzer Tool®* (Integrated DNA Technologies®) (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer/>) e selecionados seguindo os parâmetros: $40\text{ }^{\circ}\text{C} \leq \text{hairpin}$; $0 \leq \text{pareamento self-dimer} \leq 3$ e $0 \leq \text{pareamento hetero-dimer} \leq 4$. Os pares de oligonucleotídeos desenhados para cada gene estão apresentados no **Apêndice 1.9**. Os iniciadores (DNA Express Brasil® e Exxtend®- <https://www.exxtend.com.br/>) foram recebidos na forma

liofilizada, na qual os mesmos foram ressuspensado em Tris 10 mM EDTA 1 mM pH 7,0 (Thermo Scientific®) para concentração final de 100 µM e armazenados à -20 °C.

1.2.8. Extração de RNA, tratamento com DNase e síntese de cDNA

Para as análises de expressão gênica foi necessária a extração de material genético codificante (RNA), o qual foi realizada com 20 mg de material vegetal de tempo de vida de 10 dias homogeneizado com nitrogênio líquido com o kit *ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System* (Promega®) e seguiu o tratamento com DNase conforme instruções do fabricante. A quantificação e pureza do RNA foram garantidas usando um espectrofotômetro Nanodrop ND-100 (Thermo Scientific®), e amostras com razões 260/280 entre 1,8 e 2,2 foram consideradas suficientemente puras. A integridade das amostras também foi assegurada por eletroforese em gel de agarose a 1% e corada com gel de coloração SYBR Safe DNA (Thermo Scientific®).

Aproximadamente 1 µg de cada amostra de RNA foi submetido a transcrição reversa com 50 µM oligo DT; 1mM dNTP; 2,5 mM MgCl₂, 10 mM dTT, 40 U *RNAseOUT*, 200 U *SuperScript III Reverse Transcriptase* e 30 U *RNAseH*, seguindo as especificações do fabricante (Life Technologies®). O cDNA adquirido foi testado quanto à ausência de DNA genômico por PCR convencional empregando os oligonucleotídeos UPD-apiose / UDP-xilose sintase (AXS) (Forward: 5'- GCATCCAGTTCCACCGTCTC-3'; Reverse:5'- GCAGGGCGTTTCATCTTCTTT -3') e o produto obtido foi revelado por uma corrida eletroforética de 115 V em gel de agarose 1% corado com SYBR®Safe (Invitrogen®).

1.2.9. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O teste dos oligonucleotídeos e à amplificação dos genes alvos se deu por meio de amplificação por PCR. O sistema de amplificação constituiu em 1U *GoTaq DNA Polimerase* (Promega®), 0,2 mM dNTPs (Invitrogen®), 0,2 µM iniciadores e tampão 1X em 25 µL de reação. O programa de amplificação iniciou-se com 2 min de incubação à 95 °C, seguido de 30 ciclos de incubação à 95 °C por 30 s, anelamento dos iniciadores à 60 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 45 s. Em seguida, deu-se a extensão final à 72 °C por 5 min. O resultado foi

analisado em uma corrida eletroforética de 115 V em gel de agarose 1% corado com SYBR®Safe (Invitrogen® Life Technologies).

1.2.10. Análise qRT-PCR

A abundância de transcritos de *S. polyrhiza* 9505 e 7498 foi quantificada por qRT-PCR no sistema *QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR* (*Applied Biosystems pela Life Technologies*).

As reações de PCR foram realizadas com 1,4 µL de cDNA (1:10), 7 µL 2X SYBR Green Master Mix (Life Technologies®) e as seguintes condições de ciclagem foram empregadas: 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 10 s, 60 °C por 30 s e 72 °C por 30 s. Todas as reações foram realizadas em duplicata técnica e triplicata biológica e à amplificação de um único produto foi confirmada através da curva de *melting* (dados não mostrados). Depois de testar as concentrações de 200 nM, 400 nM e 800 nM do conjunto de oligonucleotídeos, a concentração ótima de 800 nM foi selecionada com base nos valores de ciclo de quantificação (C_q – do inglês *quantification cycle*), valores de eficiência de oligonucleotídeos mais altos e ausência de dímeros de oligonucleotídeos. Os valores de C_q, a eficiência da reação de cada par de oligonucleotídeos foram determinadas pelo software *LinRegPCR* (Vandesompele et al., 2002) e apenas os genes com transcritos contendo valores de C_q < 35 e eficiência > 1,7 foram selecionados (**Apêndice 1.10**).

1.2.11. Consistência e validação de genes de referência

A consistência dos candidatos à genes de referência foi determinada estatisticamente pelos softwares GeNorm v.3.5 (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>) (**Apêndice 1.11**) e NormFinder (<http://mdl.dk/publicationnormfinder.htm>) (**Apêndice 1.12**). Para confirmar a acurácia da expressão relativa e validar os genes de referência selecionados (*SpEF-1α*, *SpFBOX*, *SpARP7*, *SpPPP2A*, *Sp60S*, *SpTUA*, *SpEIF4B-L*, *SpUBC7*, *SpS24*, *SpUBC9*, *SpCYP*, *Sp18S*, *Lm18S*, *SpPSAB*), a expressão relativa do gene *SpAXS* foi avaliado em ambas as linhagens de *S. polyrhiza* (9509 e 7498). A expressão relativa de *AXS* foi obtida pela comparação da expressão média, e os valores do C_q também foram normalizados pela média geométrica da combinação dos genes de referência (**Apêndice 1.13**). Logo, análise de

variância foi conduzida pelo teste ANOVA-*one-way* seguido do teste de *post-hoc* Tukey pelo *software* R® (3.6.1).

1.3. RESULTADOS

1.3.1. Carboidratos estruturais e não estruturais

Os carboidratos de *S. polyrhiza* foram analisados como açúcares solúveis, amido e polissacarídeos da parede celular. Os açúcares solúveis e o amido representam os carboidratos não estruturais, os quais compreendem em quase metade da biomassa (**Figura 1.2**). A composição da biomassa de *S. polyrhiza* pode ser descrita como 49% de açúcares solúveis; 3% de amido; 40% de carboidratos estruturais (paredes celulares) e 8% de outros compostos (**Figura 1.2**). Quando calculados em porcentagem da biomassa, os açúcares solúveis foram principalmente frutose (20%), seguida de sacarose (17%) e glicose (11,7%), e baixas quantidades de rafinose (0,3%) (**Figura 1.2**).

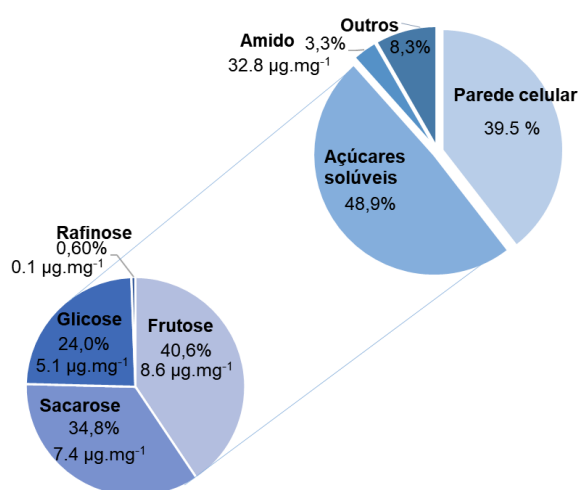


Figura 1.2. Composição da biomassa de *Spirodela polyrhiza*. A biomassa vegetal foi analisada em relação ao conteúdo de açúcares solúveis (frutose, sacarose, glicose e rafinose), amido, proporção de parede celular e outros compostos. Outros compostos representam a biomassa perdida durante o processamento, compreendendo, possivelmente, em metabólitos secundários e lipídios (n=5).

Em relação às paredes celulares, 59% eram pectinas (frações da extração com oxalato de amônio e clorito de sódio), 28% hemiceluloses (frações NaOH 0,1, 1 e 4 M) e 13% celulose (resíduo) (**Tabela 1.1**). O fracionamento da parede será descrito como as classes mencionadas (pectinas, hemiceluloses e celulose) dentro das frações correspondentes somadas. A maioria das pectinas foi composta por apiose (56,5 μg.mg⁻¹ parede celular - 38%), arabinose (23,8 μg.mg⁻¹ parede celular - 16%) e galactose (28,9 μg.mg⁻¹ parede celular - 19,5%), com

traços de fucose ($2,9 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ parede celular - 2%) (**Tabela 1.1**, colunas Oxalato e Clorito). Xilose ($39,1 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ parede celular - 32%), glicose ($17,3 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ parede celular - 14%) e galactose ($17,2 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ parede celular - 14%) foram os principais monossacarídeos das frações de hemicelulose, sugerindo xilano como a principal hemicelulose seguida de xiloglucano em *S. polyrhiza* (**Tabela 1.1**, frações de NaOH 0,1 M, 1 M e 4 M). A hemicelulose solúvel, glucomanano, foi encontrada na fração de oxalato de amônio com proporções significativas de manose ($6,1 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ parede celular) e glicose ($4,8 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ parede celular) (**Tabela 1.1**). O resíduo constitui em aproximadamente 80% de celulose ($151,7 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de parede) (ver níveis de glicose no Resíduo II na **Tabela 1.1**). A composição da fração do resíduo II também demonstra pequenas quantidades de galactose ($6,3 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ parede celular), xilose ($11,8 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ parede celular) e apiose ($5,8 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ parede celular), sugerindo possíveis ligações cruzadas de apiogalacturonanos, galactanos e xiloglucanos com as microfibrilas de celulose (**Tabela 1.1**, fração do resíduo II).

Tabela 1.1. Rendimento e composição da parede celular de *Spirodela polyrhiza*. A. Rendimento das extrações da parede celular de resíduos insolúveis em álcool (AIR) sem amido de *S. polyrhiza*. **B.** Os carboidratos estruturais mostram a composição da parede celular pela hidrólise da biomassa com TFA. Apesar da hidrólise dos monossacarídeos, a fração resíduo também foi hidrolisada com ácido sulfúrico 72% para comprovar a natureza do mesmo, uma vez que o TFA não é capaz de hidrolisar a celulose (mostrado como Resíduo II). AIR, resíduo insolúvel em álcool; Oxalato, fração de oxalato de amônio; clorito, fração de clorito de sódio; NaOH 0,1-4 M, frações de hidróxido de sódio. Todos os dados são representados pela média \pm erro padrão do açúcar em $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de peso seco de parede celular (n=5).

	AIR	Oxalato	Clorito	0,1M	1M	4M	Resíduo I	Resíduo II
A. Rendimento (%)	-	20,4 \pm 0,4	38,3 \pm 1,0	7,4 \pm 0,4	8,7 \pm 1,0	12,4 \pm 0,8	12,9 \pm 1,1	-
B. Açúcares neutros ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ massa seca)								
Galactose	74,9 \pm 5,2	17,4 \pm 0,1	11,5 \pm 0,1	10,2 \pm 0,0	4,5 \pm 0,0	2,6 \pm 0,0	7,4 \pm 0,1	6,3 \pm 0,0
Arabinose	56,0 \pm 5,1	10,1 \pm 0,1	13,7 \pm 0,1	5,4 \pm 0,0	1,6 \pm 0,0	0,8 \pm 0,0	2,2 \pm 0,0	1,5 \pm 0,0
Xilose	51,9 \pm 2,1	6,1 \pm 0,0	2,7 \pm 0,0	11,4 \pm 0,0	18,9 \pm 0,2	8,9 \pm 0,1	14,5 \pm 0,1	11,8 \pm 0,0
Apiose	49,8 \pm 4,2	44,3 \pm 0,2	12,2 \pm 0,1	20,8 \pm 0,1	6,0 \pm 0,0	5,0 \pm 0,1	19,6 \pm 0,2	5,9 \pm 0,0
Manose	43,9 \pm 3,1	6,2 \pm 0,1	3,4 \pm 0,0	0,9 \pm 0,0	0,8 \pm 0,0	0,6 \pm 0,0	0,9 \pm 0,0	3,1 \pm 0,0
Ramnose	28,4 \pm 1,7	8,0 \pm 0,0	2,5 \pm 0,0	4,0 \pm 0,0	0,5 \pm 0,0	0,6 \pm 0,0	2,9 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
Glicose	11,9 \pm 1,3	4,8 \pm 0,1	2,3 \pm 0,0	2,5 \pm 0,0	11,0 \pm 0,2	3,8 \pm 0,0	7,8 \pm 0,1	151,7 \pm 0,2
Fucose	7,2 \pm 0,6	2,1 \pm 0,0	0,9 \pm 0,0	1,0 \pm 0,0	1,2 \pm 0,0	0,6 \pm 0,0	1,8 \pm 0,0	1,1 \pm 0,0

1.3.2. Mapeamento de ortólogos nos cromossomos de *S. polyrhiza*

Dos trinta e sete genes-alvo da via de nucleotídeos-açúcares (**Figura 1.1**) foram recuperadas 190 sequências ortólogas de *S. polyrhiza* (**Figura 1.3**, **Apêndice 1.2**). As 190 sequências encontradas apresentam similaridade acima

de 70% com *A. thaliana* (**Apêndices 1.2, 1.3 e 1.4**) e domínios proteicos conservados (**Apêndices 1.5, 1.6 e 1.7**).

Esses 190 genes foram divididos nas categorias: “metabolismo de açúcar e amido” (49 ortólogos), “pectinas” (54 ortólogos), “hemiceluloses” (65 ortólogos), e “celulose” (23 ortólogos) (**Figuras 1.1 e 1.3**). A distribuição dos genes de amido, sacarose e paredes apresentam maior incidência nos cromossomos 1 e 2 (24 e 22 genes, respectivamente) que são os maiores cromossomos (14,77 e 11,37 Mb) (**Figura 1.3 e 1.4**). Os outros cromossomos (3, 4, 5, 8, 9, 13 e 15 - que têm ~ 7,7 Mb) têm entre 7 e 15 genes e os demais cromossomos (6, 7, 10, 12, 14, 16, 17, 18, 19 e 20 - que têm ~ 5,3 Mb) tem menor incidência de ortólogos (**Figura 1.2 e 1.3**). Assim, pode-se dizer que alguns desses genes poderiam ser particionados diferencialmente no genoma de *S. polyrhiza*. O tamanho dos cromossomos não está relacionado com a ocorrência de genes, sugerindo que outros fatores estão associados à topologia dos genes das vias do carbono no genoma de *S. polyrhiza*.

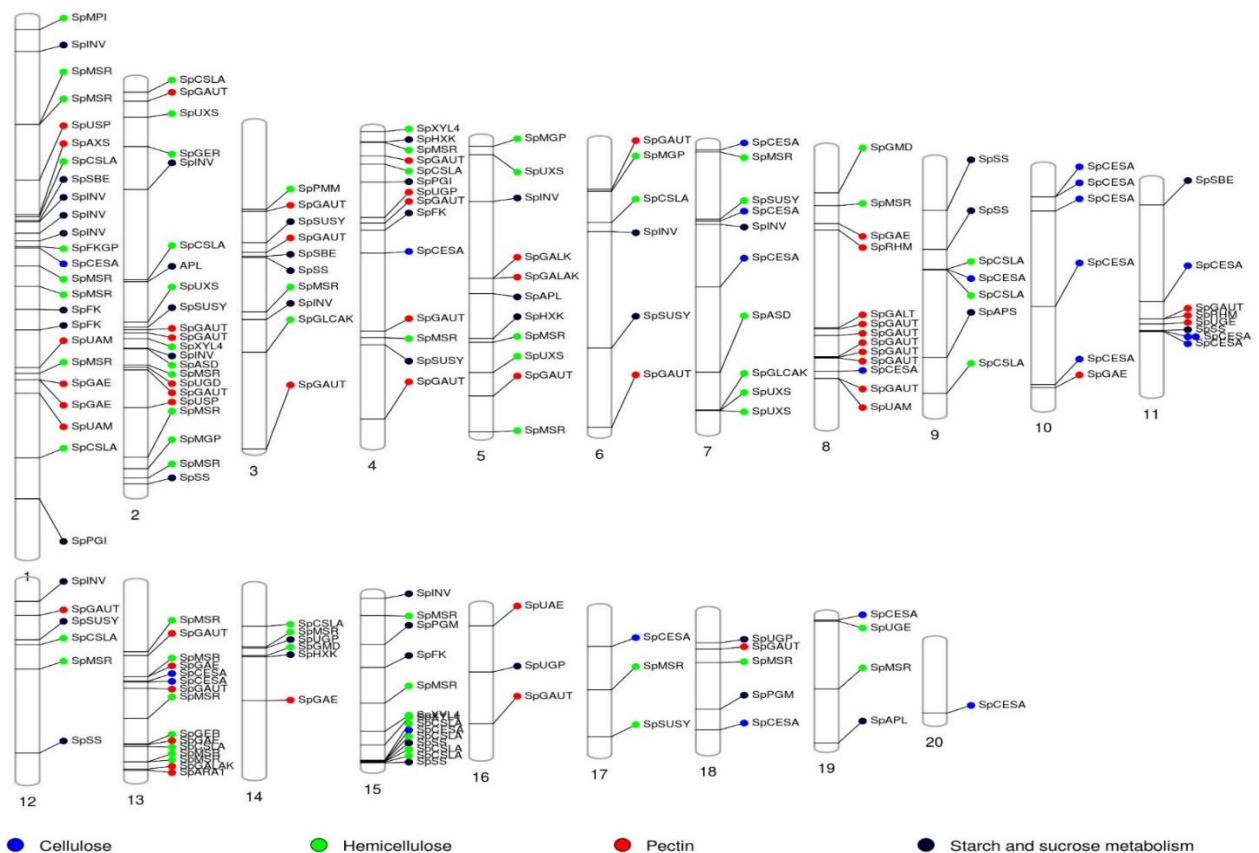


Figura 1.3. Ideograma cromossômico dos genes da via do nucleotídeos-açúcares. *S. polyrhiza* possui 20 cromossomos, as cores representam cada classe de polissacarídeo, sendo azul para pectinas, verde para hemiceluloses, verde escuro para celulose, preto para catabolismo de açúcar e a entrada de o carbono na via UDP-glicose e rosa para a síntese de

amido pela via ADP-glicose. Para os nomes dos genes, ver Apêndice 1.1.

Quando analisados de acordo com as vias metabólicas (**Figura 1.1**) que levam à formação de açúcares não-estruturais (amido, sacarose e monossacarídeos) e polímeros de parede celular (pectinas, hemiceluloses e celulose), a distribuição varia de acordo com a categoria. Os genes relacionados ao metabolismo das vias de açúcares (total de 35 genes) são agrupados nos cromossomos 1-7 e 12 e 14-18. Por outro lado, os genes relacionados ao amido são distribuídos mais aleatoriamente pelos cromossomos 1-3, 5, 9, 11-13, 15 e 19. Já os genes relacionados as pectinas (um total de 54 ortólogos) exibem um grupo mais concentrado em cromossomos 1-5, 8 e 13, com mais de 70% dos genes da categoria. O restante dos cromossomos, 4 (8.6 Mb), 6 (8 Mb), 7 (7.9 Mb), 10 (6,6 Mb), 14 (5,6 Mb), 16 (4,45 Mb), 17 (4,3 Mb) e 18 (4,13 Mb) têm menores número de genes. Para hemiceluloses (65 ortólogos), alguns cromossomos apresentam um grande número de genes (2, 5, 13 e 15) com aproximadamente 50% dos genes da categoria. Em relação à celulose, aproximadamente 50% dos genes estão nos cromossomos 7, 10 e 11 (**Figura 1.3 e 1.4**).

Cromossomo	Número de genes	Metabolismo de amido e sacarose	Pectinas	Hemiceluloses	Celulose
1	24	8	6	9	1
2	22	5	6	11	0
3	10	4	4	2	0
4	14	4	5	4	1
5	11	3	3	5	0
6	7	3	2	2	0
7	10	2	1	4	3
8	13	0	10	2	1
9	7	3	0	3	1
10	6	0	1	0	5
11	9	2	3	0	4
12	6	3	1	2	0
13	15	0	6	7	2
14	6	2	1	3	0
15	14	5	0	8	1
16	3	1	2	0	0
17	3	1	0	1	1
18	5	2	1	1	1
19	4	1	1	1	1
20	1	0	0	0	1
TOTAL	190	49	53	65	23
	%	25,8	27,9	34,2	12,1

Figura 1.4. Distribuição dos genes pelos cromossomos de *Spirodela polyrhiza*. Heatmap do número de genes em cada cromossomo de *S. polyrhiza* dividido em cinco categorias (metabolismo de açúcar, amido, pectina, hemicelulose e celulose). Quanto mais escuro o tom de azul maior a expressão e quanto mais branco menor a expressão.

1.3.3. Eficiência dos oligonucleotídeos e amplificação qRT-PCR

Todos os pares de oligonucleotídeos específicos apresentaram valores de ciclo de quantificação (C_q) ≤ 35 e as reações alcançaram a fase estacionária de saturação da reação. A amplitude do C_q dos genes avaliados está apresentada no **Apêndice 1.10**, variando de 14 a 35 ciclos. Dos candidatos a genes de referência, os valores de C_q de *Lm18S* ($14,0 \pm 0,5$) e *SpPSAB* ($18,1 \pm 0,3$) são os mais baixos, enquanto *SpCYP*, *SpTUA* e *SpUBC9* tem um valor intermediário (~ 25) e *Sp18S*, *Sp60S*, *SpARP7*, *SpEF1*, *SpELF4B*, *SpFBOX*, *SpPP2A*, *SpS24* e *SpUBC7* são os mais altos (~ 28). Enquanto que os genes envolvidos na síntese da parede celular apresentam os valores de C_q em mais de 50% dos genes testados acima de 30 ciclos, sendo o UDP-apiose / UDP-xilose sintase (*SpAXS*) ($22,5 \pm 0,1$) tendo o menor valor C_q e UDP-glucuronato descarboxilase (*SpUXS3*) ($35,0 \pm 0,1$) o maior valor C_q (**Apêndice 1.10**).

1.3.4. Níveis de expressão de nucleotídeos-açúcares

Os níveis de expressão relativa de genes que codificam aos nucleotídeos-açúcares foram normalizados com *SpARP7* e *SpPP2A* (**Apêndice 11, 12 e 13**). O intervalo de expressão dos alvos avaliados foi de 0,5-1,4, portanto, três níveis foram estabelecidos, de 0,5-0,8 como Baixo; de 0,81-1,1 como Médio e 1,11-1,4 como Alto.

Dos 190 ortólogos dos genes relacionados ao açúcar-nucleotídeos, 29 alvos e 38 ortólogos foram selecionados para avaliação de expressão usando qRT-PCR (**Tabela 1.2**), pois foram estes que amplificaram com sucesso o respectivo gene alvo. A expressão da *sacarose sintase* (*SpSUSY*), *invertase* (*SpINV*), *hexoquinase* (*SpHXK*) e *frutoquinase* (*SpFK*) denotam atividades anabólicas que levam à síntese de amido e monossacarídeos (**Figura 1.1 e Tabela 1.2**). Entre estes, *SpINV* apresentou o menor valor de expressão, enquanto os outros genes mencionados variaram de 0,62 a 0,74 (**Tabela 1.2**). A síntese do amido ocorre através da via ADP-glicose (**Figura 1.1**), que envolve a ADP-glicose pirofosforilase (codificada por *APL* e *APS*), amido sintase (SS), enzima ramificadora de α -glucanos (SBE), amido sintase ligada ao grânulo (GBSS). Esses alvos apresentaram um nível de expressão Média quando comparados aos genes relacionados ao metabolismo de açúcar (**Tabela 1.2**). O

Alto nível da enzima ramificadora 1,6- α -glucano (*SpSBE* - 0,9) pode indicar que o amido presente em *S. polyrhiza* é altamente ramificado. A via de síntese do amido em lentilhas-d'água tem particular importância devido à flexibilidade da modulação para o acúmulo de amido em função da atividade fotossintética.

As pectinas possuem a estrutura mais complexa entre os polissacarídeos da parede celular, sendo compostas por vários monossacarídeos. Nas lentilhas-d'água, as pectinas representam 49% da composição da parede (**Figura 1.2 e Tabela 1.1**). A avaliação dos níveis de expressão associados às pectinas deve ser analisada com cautela devido à coexistência dos mesmos açúcares entre as pectinas e hemiceluloses. O transcrito envolvido na síntese do esqueleto das pectinas tem os níveis relativos mais elevados (α -1,4-galacturonosiltransferase - *GAUT*; UDP-glicose-4-epimerase - *UGE*), indicando um alto dreno de carbono para estes carboidratos (**Tabela 1.2, Figuras 1.4 e 1.1**). Esse alto dreno de carbono para a síntese de pectinas também foi verificado com os resultados obtidos no fracionamento da parede, uma vez que essa classe de polissacarídeos compõe metade da parede de *S. polyrhiza* (**Tabela 1.1**). A abundância de transcritos de *SpAXS*, que codifica a enzima responsável pela biossíntese da apiose, foi 1,8 vezes menor do que outro gene relacionado à pectina (*SpGAUT1*), enquanto a apiose foi um dos monossacarídeos neutros mais significativos encontrados na parede (**Tabelas 1.2 e 1.1**).

Foram avaliados a expressão de 12 genes relacionados a biossíntese das hemiceluloses. Os genes relacionados principalmente à biossíntese de xiloglucanos, xilanos e mananos foram encontrados nas categorias Média e Baixa (**Tabela 1.2**). O transcrito da síntese de glucomanano foi o segundo mais expresso entre os transcritos avaliados (glucomanano-4- β -manosiltransferase - *SpCSLA* - 1,3) (**Tabela 1.3**).

Tabela 1.2. Expressão gênica de 38 ortólogos relacionados a carboidratos e nucleotídeos-açúcares em *Spirodela polyrhiza*. Expressão e função de genes selecionados de genes associados à via nucleotídeo-açúcar em *Spirodela polyrhiza*. O mapa foi gerado por uma comparação de todos os açúcares avaliados com eles próprios. Os níveis de expressão em todas as amostras analisadas foram normalizados para os genes de referência ARF7 e PP2A.

	Gene	Nível de expressão	Nome do gene	Função gênica
Metabolismo de amido e sacarose	<i>SBE</i>	0.90	Enzima ramificadora de amido	Ramificação do polímero amido
	<i>SS2</i>	0.87	Amido sintase	Sintetiza a cadeia principal de amido
	<i>APL</i>	0.86	Glicose-1P-adeniltransferase	Converte Glicose-1P em ADP-Glicose, o qual é substrato para a síntese de amido
	<i>SUSY1</i>	0.74	Sacarose sintase	Produz UDP-Glicose, a base para a síntese dos polissacarídeos de parede com exceção dos mananos
	<i>SS1</i>	0.74	Amido sintase	Sintetiza a cadeia principal de amido
	<i>HXK</i>	0.72	Hexoquinase	Produz glicose-6P, estando envolvido na síntese de amido e parede celular
	<i>UGP2</i>	0.72	UDP-glicose pirofosforilase	Converte UDP-glicose em glicose-1P, determinando a via para síntese de amido ou parede celular
	<i>FK</i>	0.70	Frutoquinase	Converte Frutose em Fru-6P, o qual serve de substrato para a síntese de manano, amido e polissacarídeos de parede celular
	<i>UGP1</i>	0.69	UDP-glicose pirofosforilase	Converte UDP-Glicose into Glicose-1P, determinando a via para síntese de amido ou de parede celular
	<i>UGP1</i>	0.69	UDP-glicose pirofosforilase	Converte UDP-glicose em glicose-1P, determinando a via para síntese de amido ou parede celular
	<i>PGI</i>	0.63	Fosfoglicose-isomerase	Converte Frutose-6P em Glicose-6P, determinando a via para síntese de amido ou de parede celular
	<i>SUSY2</i>	0.62	Sacarose sintase	Produz UDP-Glicose, a base para a síntese dos polissacarídeos de parede com exceção dos mananos
	<i>INV</i>	0.52	Invertase	Hidrolisa sacarose em glicose e frutose formando Glicose-6P and Frutose-6P, respectivamente
	Pectina	<i>GAUT1</i>	1.37	α -1,4-galacturonosiltransferase
<i>UGE</i>		1.20	UDP-glicose-4-epimerase	Converte UDP-glicose em UDP-galactose, determinando ramnogalacturonanos, galactomananos, xiloglucano e galactanos
<i>USP</i>		1.05	UDP-açúcar-pirofosforilase	Converte UDP-Glucuronato em Glucuronato-1P, determinando a síntese de ramnogalacturonano do tipo II e glucuronoarabinosilanos
<i>RHM</i>		0.92	Enzima de biosíntese de ramnose	Converte UDP-Glicose em UDP-Ramnose, determinando a via em direção a síntese de pectinas (Ramnogalacturonanos)
<i>GAUT2</i>		0.89	α -1,4-galacturonosiltransferase	Polimeriza a cadeia principal de pectinas (homogalacturonanos)
<i>UAE</i>		0.89	UDP-arabinose-4-epimerase	Converte UDP-Xilose em UDP-Arabinose, determinando a síntese de arabinanos e contribuindo para a síntese de arabinosilano e xiloglucanos
<i>GAUT3</i>		0.84	α -1,4-galacturonosiltransferase	Polimeriza a cadeia principal de pectinas (homogalacturonanos)
<i>ARA1</i>		0.83	Arabinoquinase	Converte Arabinose-1P em arabinose, a qual é usada na polimerização das cadeias de arabinanos e ramificações de arabinosilanos e xiloglucanos
<i>UAM</i>		0.82	UDP-arabinopiranosose-mutase	Converte UDP-Arabinose em UDP-Arabinose, determinando a via em direção a síntese de arabinanos
<i>GALAK2</i>		0.81	Galacturonoquinase	Converte UDP-Ácido galacturônico em Ácido galacturônico-1P, determinando a síntese de homogalacturonanos
<i>AXS</i>		0.76	UDP-apiose/UDP-xilose sintase	Converte UDP-Ácido galacturônico em UDP-Apiose, determinando a via entre a síntese de apiogalacturonanos e ramnogalacturonanos do tipo II
<i>GALAK1</i>		0.67	Galacturonoquinase	Converte UDP-Ácido galacturônico em Ácido galacturônico-1P, determinando a síntese de homogalacturonanos
<i>UGD</i>		0.65	UDP-glicose-6-desidrogenase	Converte UDP-Glicose em UDP-Ácido galacturônico, determinando a via de polímeros de pectinas e hemiceluloses
<i>GLCAK</i>		0.54	Glucuronosiltransferase	Converte UDP-Glucuronato em Glucuronato-1P, determinando a síntese de ramnogalacturonano do tipo II e glucuronoarabinosilano
Hemiceluloses	<i>CSLA</i>	1.30	Glucomanano-4 β -manosiltransferase	Polimeriza a cadeia principal de mananos
	<i>GER</i>	1.03	GDP-fucose sintase	Converte GDP-manose em GDP-Fucose, contribuindo para a estrutura de pectinas e xiloglucanos
	<i>MPI</i>	0.90	Manose-6P-isomerase	Converte Frutose-6P em Manose-6P, determinando a via para a síntese de mananos e glicoproteínas
	<i>UXS 2</i>	0.86	UDP-glucuronato-decarboxilase	Converte UDP-Glucuronato em UDP-Xilose determinando a síntese de xilanos, arabinosilano e xiloglucanos
	<i>UXS 4</i>	0.86	UDP-glucuronato-decarboxilase	Converte UDP-Glucuronato em UDP-Xilose determinando a síntese de xilanos, arabinosilanos e xiloglucanos
	<i>XYL4</i>	0.84	1,4- β -xilase	Converte UDP-Xilose em xilose que é incorporada pela <i>CSLD5</i> na cadeia de xilanos
	<i>UXS 3</i>	0.76	UDP-glucuronato-decarboxilase	Converte UDP-Glucuronato em UDP-Xilose, determinando a síntese de xilanos, arabinosilanos e xiloglucanos
	<i>MGP</i>	0.74	Manose-1P-guaniltransferase	Converte Manose-1P em GDP-Manose, determinando a via para a síntese de mananos e glicoproteínas
	<i>FKGP</i>	0.73	Fucoquinase	Converte GDP-Fucose em fucose, contribuindo para a ramificação de xiloglucanos e pectinas
	<i>GMD</i>	0.72	GDP-manose-4,6-desidratase	Converte GDP-Man em manose, determinando a via para a síntese de mananos e glicoproteínas
	<i>UXS 1</i>	0.69	UDP-glucuronato-decarboxilase	Converte UDP-Glucuronato em UDP-Xilose determinando a síntese de xilanos, arabinosilanos e xiloglucanos
<i>PMM</i>	0.67	Fosfomanomutase	Converte Manose-6P em Manose-1P, determinando a via para a síntese de mananos e glicoproteínas	

1.4. DISCUSSÃO

A parede celular define as características das células vegetais, estando relacionadas à estrutura e proteção da planta. Desta forma, a maior parte do fluxo de carbono em uma planta é direcionada para a sua síntese (VERBANČIČ et al., 2017). Tavares e Buckeridge (2015) levantaram a hipótese de que as paredes celulares formam um Código Glicômico, propondo que a criptografia é realizada pelo mapeamento dos monossacarídeos nos polissacarídeos da parede celular. A teoria foi posteriormente expandida para a matriz extracelular de todos os organismos vivos (BUCKERIDGE, 2018).

As vias dos nucleotídeos-açúcares se relacionam diretamente com o fluxo de carbono da fotossíntese e com a distribuição de hexoses-fosfato para sintetizar a parede celular, açúcares solúveis e amido (VERBANČIČ et al., 2017). Além disso, pontos críticos das vias pentoses-fosfato, envolvidas na síntese de ácidos orgânicos, nucleotídeos, aminoácidos, lignina e polifenóis, interconectam-se com a síntese dos nucleotídeos-açúcares (CARPITA et al., 2001). Portanto, o entendimento dessa via elucidada o metabolismo da planta em relação a distribuição de carbono, impactando diretamente no acúmulo de biomassa. Foram recuperados os genes relacionados ao metabolismo de carboidratos que levam à formação da parede celular e alguns níveis de transcritos foram correlacionados com as características bioquímicas da lentilha-d'água gigante, *S. polyrhiza*. Além disso, análises de transcriptômica foram realizadas em algumas espécies de lentilhas d'água: *Landoltia punctata* sob privação de nutrientes (TAO et al., 2013), *S. polyrhiza* 7498 sob tratamento de ácido abscísico (WANG et al. 2014), e alguns estudos de *Lemna* sob diferentes tratamentos (YU et al., 2017). No entanto, a maioria dos dados não está disponível em bancos de dados públicos. Os únicos dados de RNA-seq disponíveis de *S. polyrhiza* foram obtidos a partir de uma resposta ao tratamento que induz a formação de turions (estado de dormência), que é conhecido por ser menor e distinto da linhagem 9509 de *S. polyrhiza*, alvo deste estudo (MICHAEL et al., 2017).

Neste capítulo foram examinados os genes relacionados ao metabolismo de carboidratos que levam a formação da parede celular da lentilha-d'água gigante. *S. polyrhiza* 9509 possui um genoma de 138,6 Mbp distribuído em 20

cromossomos com 18.507 genes preditos. Este genoma tem baixa heterozigose, baixos níveis de metilação e baixos teores de proteínas não essenciais, transposons, rDNA e repetições terminais longas (MICHAEL et al., 2017). Um conjunto de 190 ortólogos relacionados a reações que levam à síntese de polissacarídeos da parede em plantas (principalmente nucleotídeos-açúcares) foram pesquisados e mapeados nos cromossomos de *S. polyrhiza*. Esses genes estão agrupados em *clusters* em diferentes cromossomos de acordo com as vias que levam à formação de carboidratos não-estruturais (amido e sacarose), pectinas, hemiceluloses e celulose. Padrões de *clustering* foram encontrados para as categorias de "metabolismo de açúcar", "pectinas" e "hemiceluloses". No entanto, para amido e celulose, a distribuição parece mais randômica.

O mapeamento de genes candidatos da redução da recalcitrância das paredes celulares à hidrólise geralmente é realizado usando análises de QTL (MUCO et al., 2015, ZHANG et al., 2016), porém seguindo a ideia de que processos metabólicos endógenos podem ser usados para melhorar as paredes celulares para uso de bioenergia (GRANDIS et al., 2014; TAVARES e BUCKERIDGE, 2015) e que o mapeamento do genoma engrandece o levantamento de genes de interesse (NAWAZ et al. 2017).

Carpita *et al.* (2001) dividiu o processo total de síntese de parede em seis estágios: (1) síntese de nucleotídeos-açúcares e monolignóis. Estes últimos não foram estudados aqui porque a lignina é encontrada em baixos níveis em lentilhas-d'água (PAGLIUSO et al., 2020); (2) síntese de oligômeros e polissacarídeos na membrana plasmática e no retículo endoplasmático-Golgi; (3) direcionamento e a secreção dos materiais derivados do complexo de Golgi; (4) a montagem e padronização arquitetônica de polímeros; (5) rearranjo dinâmico durante o crescimento e diferenciação celular; (6) desmontagem da parede e catabolismo dos polímeros. Cada uma dessas etapas é fundamental para abordar a matriz final, e cada uma delas é complexa e carece de um entendimento completo. Neste capítulo o foco foi no estágio 1. Neste estágio é crucial no desenvolvimento por causa da síntese de monossacarídeos, que são os blocos construtores dos polissacarídeos. Portanto, compreender a partição de carbono para a parede celular pode otimizar e direcionar alvos para aplicações industriais. O estágio 1 também é essencial, pois suas reações determinam o destino dos nucleotídeos-açúcares nos polissacarídeos da parede

de uma determinada planta. Do ponto de vista biotecnológico, esse estágio supostamente determinaria a composição da parede celular, e o controle dessas reações poderia ser fundamental para a engenharia da parede. Por exemplo, espera-se que o equilíbrio entre a expressão e as atividades enzimáticas relacionadas a apenas seis genes (*CESA*, *RHM*, *UGE*, *UGD* e *MPI* - **Figura 1.1**) determine o equilíbrio final dos polissacarídeos que serão depositados nas paredes.

A celulose é o centro da parede celular e a mesma é sintetizada na membrana plasmática por complexos de celulose sintases (*CESA*; EC 2.4.1.12) (LEI et al., 2012). No mapeamento dos genes de *S. polyrhiza*, identificamos 23 ortólogos de genes de celulose sintases (**Tabela 1.2**), distribuídos em 13 cromossomos (1,4,7-11,13,15,17-20) (**Figuras 1.3 e 1.4**). A celulose é composta por cadeias de β -1,4-D-glicose que, em *S. polyrhiza*, representam apenas 13% da parede (**Tabela 1.1**), corroborando com estudos prévios de Ge et al. (2012) e Bayrakci e Koçar (2014). No entanto, alguns estudos relataram lentilhas d'água com conteúdo de celulose variando de 25 a 55% (LONGLAND, FRY e TREWAVAS 1989; YADAV et al. 2016). A celulose exibe certa recalcitrância à hidrólise, o que interfere na produção de biocombustíveis. No entanto, a recalcitrância pode ser contornada com modificações da cristalinidade da celulose (DADI, SCHALL e VARANASI, 2007; HARRIS, STORK e DEBOLT, 2009; HARRIS et al., 2012). Na lentilha-d'água, a baixa proporção de celulose em comparação com os 40% encontrados nas plantas terrestres (GE et al. 2012) pode indicar maior importância das pectinas e hemiceluloses para as paredes dessa planta. A maior proporção de pentoses em lentilhas d'água é decorrente dos altos níveis de apiose e xilose (pectinas e hemiceluloses, respectivamente) (**Tabela 1.1 e Apêndice 1.5**). Além disso, seu aspecto negativo para a fermentação torna o aumento de celulose adequado para bioeletricidade e etanol de segunda geração. No entanto, para este fim, é necessário um estudo profundo da família multigênica de celulose sintases para avaliar essas ligações cruzadas de polímeros em lentilhas d'água. Apesar de detectar a escassez de celulose nas paredes celulares de *S. polyrhiza* e entender completamente a aplicação da celulose à bioenergia, análises mais precisas precisam ser realizadas, com foco na síntese desse polissacarídeo.

As pectinas são responsáveis por unir as porções celulose-hemicelulose na parede celular e também são encontradas na lamela média, regiões de abscisão, xilema e células de fibras (MOHNEN, 2008). As pectinas são polissacarídeos ricos em ácido galacturônico, a formar cinco classes distintas: homogalacturonanos (HG), ramnogalacturonanos (RG), apiogalacturonanos (API) e xilogalacturonanos (XGA) (CAFFALL e MOHNEN, 2009). O esqueleto das pectinas (ácidos galacturônicos ligados α -1,4) é construído a partir de epimerização de UDP-Glicose em UDP-Galactose por UDP-Glicose-4-epimerase (UGE; EC 5.1.3.2), seguido pela formação de UDP-Ácido Galacturônico e catálise da pectina por galacturonoquinase (GALAK, EC 2.7.1.44) e α -1,4-galacturonosil transferase (GAUT, EC 2.4.1.43) (CAFFALL e MOHNEN, 2009; ATMODOJO et al., 2011; STERLING et al., 2006; YANG et al., 2009) (**Figura 1.1**). Alternativamente, o UDP-Ácido Galacturônico pode ser formado a partir da oxidação de UDP-Glicose em UDP-Ácido Glucurônico por UDP-Glicose desidrogenase (UGD; EC 1.1.1.22), seguido pela epimerização de UDP-Ácido Galacturônico por UDP-Glucuronato-4-epimerase (GAE, EC 5.1.3.6) (GU e BAR-PELED, 2004; MØLHØJ et al., 2004) (**Figura 1.1**). A biomassa das lentilhas-d'água é rica em pectinas (GE et al., 2012; ORON, 1994; SODA et al., 2015; SU et al., 2014; SOWINSKI et al., 2019, PAGLIUSO et al., 2019), sendo 58% das paredes de *S. polyrhiza* (**Tabela 1.1**). Algumas dessas pectinas provavelmente estão ligadas às microfibrilas de celulose, isso pode ser demonstrado pelas análises de monossacarídeos, uma vez que constituintes exclusivos de pectinas (apiose e ramnose) são encontrados nas frações residuais de celulose (**Tabela 1.1**, resíduo I). Como também, resultados semelhantes indicando a presença de pectinas á celulosas foram relatados por Yadav et al., (2016); Ge et al., (2012); Soda et al. (2015); Zhao et al. (2014). Este alto teor de pectina e as possíveis interligações com a celulose impactam negativamente a produção de bioetanol celulósico devido à barreira das enzimas hidrolíticas em acessar os açúcares fermentáveis. Lionetti *et al.* (2010) descobriram que a redução da metil esterificação de homogalacturonanos aumenta a eficiência da sacarificação da biomassa de *Arabidopsis*. Latarullo *et al.* (2017) revisaram a importância das pectinas na recalcitrância da parede celular e apontaram a importância dessa classe de polissacarídeos da parede celular para a bioenergia, propondo que mais pectinases deveriam ser

empregadas em coquetéis enzimáticos para fornecer açúcares fermentáveis para a produção de bioetanol. As lentilhas d'água poderiam se beneficiar das modificações da pectina para atingir níveis mais altos de sacarificação. Porém, é fundamental lembrar que a lentilha-d'água é uma planta aquática e as pectinas provavelmente são cruciais para a manutenção do crescimento e desenvolvimento nesse tipo de ambiente. Assim, qualquer estratégia para diminuir a proporção de pectina em lentilhas-d'água precisará considerar seus possíveis efeitos sobre o crescimento.

UDP-Glucuronato também serve como substrato para a síntese de UDP-Xilose e UDP-Apiose por UDP-Glucuronato descarboxilase e UDP-apiose / UDP-xilose sintase (UXS e AXS, EC 4.1.1.35), que são necessárias para a biossíntese de xilogalacturonanos e apiogalacturonanos (LONGLAND, FRY e TREWAVAS 1989) (**Figura 1.1**). Xilogalacturonanos e apiogalacturonanos são derivados de homogalacturonanos com substituição de O-3, ou O-2 e O-3 ligados por xilose e apiose, respectivamente (MOHNEN, 2008). Essas duas classes pécnicas são *trade-offs* entre as subfamílias *Lemnoideae* e *Wolffioideae* (AVCI et al., 2017, PAGLIUSO et al., 2018), destacando-se como um ponto interessante para análise. A apiose representa 15,4% (49,8 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) de parede de AIR, sendo o principal monossacarídeo encontrado nas frações de oxalato de amônio (44,3 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) e clorito de sódio (12,2 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) (**Tabela 1.1**), mesmo com uma baixa expressão relativa de transcrito de 0,76 (**Tabela 1.2**). Por outro lado, a xilose representa 16,1% (51,9 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) das frações AIR e 5,8% das frações oxalato de amônio (6,2 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) e clorito de sódio (5,4 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) (**Tabela 1.1**). As pentoses apiose e xilose não são fermentáveis por *Saccharomyces cerevisiae* convencional (VAN MARIS et al., 2006). Atualmente, cepas de *S. cerevisiae* geneticamente modificadas podem fermentar xilose (KÖTTER e CIRIACY, 1993; KARHUMAA et al., 2007; BETTIGA et al., 2009; MOYSÉS et al., 2016), mas ainda não são totalmente empregadas na indústria. Portanto, altos níveis de apiose e xilose, ainda, não são considerados adequados para a produção de biocombustíveis. A depleção de *AtUXS* (*A. thaliana*) aumenta a liberação de glicose para sacarificação em 18%, juntamente com maior acessibilidade à clivagem enzimática de xilanos (KUANG et al., 2016). Xilanos contribui para a redução da recalcitrância pelo comprimento do polissacarídeo e arranjo com outros polímeros da parede celular, conseqüentemente melhorando a produção

de biocombustíveis (KUANG et al., 2016). Por outro lado, a apiose é essencial para o desenvolvimento (AHN et al., 2006; ZHAO et al., 2020). Em lentilhas-d'água, a apiose está positivamente relacionada ao crescimento rápido e negativamente ao acúmulo de amido (PAGLIUSO et al., 2018). Assim, a redução do teor de apiose aumenta hipoteticamente os níveis de amido, o que seria benéfico para o bioetanol de primeira geração. O teor de amido em *S. polyrhiza* foi de 3.3% (**Figura 1.2**). No entanto, os teores desse carboidrato não-estrutural podem ser aumentados em até 70% por meio de alterações nas condições de crescimento (XIAO et al., 2013; YIN et al., 2015), sem a necessidade de abordagens biomoleculares.

Além das aplicações, os apiogalacturonanos apresentam potencial na biorefinaria para cosméticos e veículos para medicamentos (FILBRY et al. 2007; POPOV et al. 2006). Ainda esses polissacarídeos e as demais pectinas podem ser empregadas como agentes de gelificação e estabilização nas indústrias alimentícia e cosmética, como também algumas moléculas relacionadas às pectinas podem melhorar a saúde humana reduzindo o câncer, colesterol, os níveis de glicose no sangue e estimulam a resposta imune (JENKINS et al.; 1975; JENKINS et al. 1977; SALMAN et al. 2008; LECLERE, CUTSEM E MICHIELS 2013; POPOV e OVODOV 2013; ZHANG, XU e ZHANG 2015; RAMOS DO PRADO et al. 2017). Assim, as propriedades do apiogalacturonanos também devem ser investigadas para esses propósitos alternativos e como sua biossíntese depende de uma cópia única no genoma de *S. polyrhiza*, as abordagens moleculares devem ser bastante interessantes.

A fucose é um monossacarídeo presente no ramnogalacturonano do tipo II (RG-II) e no xiloglucano. Este é derivado de GDP-Manose pela ação de GDP-manose-4,6-desidratase (GMD, EC 4.2.1.47) e GDP-manose-3,5-epimerase-4-redutase (GER, EC 1.1.1.271) (NAKAYAMA et al., 2003) (**Figura 1.1**). As lentilhas d'água apresentam uma pequena proporção de polissacarídeos fucosilados (**Tabela 1.1**). No entanto, este açúcar é essencial para a manutenção do RG-II (REUHS et al., 2004) e crescimento (REITER, CHAPPLE e SOMERVILLE 1997). RG-II é a subclasse de pectina mais complexa de polissacarídeos da parede celular, contendo uma estrutura de ácido α -1,4-galacturônico com várias ramificações laterais consistindo de 12 açúcares e mais de 20 ligações glicosídicas (CAFFALL e MOHNEN, 2009; BAR-PELED,

URBANOWICZ e O'NEILL, 2012). Por outro lado, RG-I apresenta uma estrutura com repetição do dissacarídeo [α -D-ácido galacturônico-1-2- α -1-ramnose-1,4]_n com cadeias laterais de α -L-arabinose *f* e resíduos de β -D-galactose ligados às unidades dos açúcares ramnosil (MOHNEN, 2008; CAFFALL e MOHNEN, 2009). Ramnose é um açúcar exclusivo dos ramnogalacturonanos, o qual é sintetizado a partir de UDP-Ramnose por meio de uma reação de três estágios envolvendo desidratação, epimerização e redução de UDP-Glicose em UDP-Ramnose pela UDP-Glicose-4,6-epimerase/enzima de síntese de ramnose (RHM, EC. 4.2.1.76) (REITER e VANZIN 2001) (**Figura 1.1**). O nível de expressão relativa de *SpRHM* foi Médio (0,91) (**Tabela 1.2**), e os níveis de ramnose foi de 8,8% da parede celular (28,36 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ AIR - **Tabela 1.1**). A superexpressão de *AtRHM1* também aumentou o conteúdo de galactose com uma redução concomitante de glicose em *Arabidopsis* (WANG et al., 2009). No entanto, o silenciamento de *AtRHM1* não alterou o padrão da parede (WANG et al., 2009), o que pode não impactar na produção de biocombustíveis. No entanto, uma mutação no gene *RHM* em *A. thaliana* suprimiu os genes da repetição de extensina rica em leucina (*leucine-rich repeat extensin - lrx*) que alteram a formação raízes (DIET et al., 2006), e também polissacarídeos de ramnose são responsáveis por coordenar a distribuição helicoidal das folhas durante o crescimento da planta (SAFFER et al., 2017). Portanto, alterar o gene *RHM* em *S. polyrhiza* provavelmente mudaria a morfologia da fronde e afetaria o desenvolvimento. O açúcar ramnose é amplamente utilizado em cosméticos, e também confere atividades anti-inflamatórias, antivirais e anticâncer (CHOI et al., 2009; TOMSIK et al., 2011; RHO et al., 2011; LEE et al., 2012; PAGEON et al., 2019). Assim, a ramnose também pode ser uma aplicação de nicho por meio de uma superexpressão de *SpRHM* com foco em biorrefinaria.

UDP-arabinose piranose (*p*) é convertida na forma furanosídica (*f*) no citosol por UDP-arabinose mutase (UAM, EC 5.4.99.30) (RAUTENGARTEN et al., 2017). Alternativamente, UDP-arabinose *p* pode ser convertida em arabinose pela ação sequencial de UDP-açúcar pirofosforilase (USP, EC 2.7.7.64) e arabinoquinase (ARA1, EC 2.7.1.46) (**Figura 1.1**). A arabinose é uma hexose encontrada em arabinanos, nas ramificações de ramnogalacturonanos e em xilanos. Os arabinanos podem ser hidrolisados pela enzima α -arabinofuranohidrolase (ASD, EC 3.1.55), capaz de hidrolisar a UDP-Xilose

(CHÁVEZ MONTES et al., 2008). A análise bioquímica da parede celular de *S. polyrhiza* mostrou que arabinose constitui 17,3% do AIR ($56 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ parede celular) e foi encontrada principalmente nas frações ricas em pectina (oxalato de amônio $-10,1 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ parede celular e clorito de sódio $-13,7 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ parede celular) e $0,1 \text{ NaOH } 1\text{M}$ (parte da fração hemicelulose – $5,35 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ parede celular) (**Tabela 1.1**). Hipoteticamente, arabinose em *S. polyrhiza* é principalmente usada para formar cadeias de arabinanos. Arabinose hemicelulósicas são responsáveis pela recalcitrância da biomassa (TAVARES et al., 2015), também afetando negativamente a cristalinidade da celulose pelas interligações com β -1,4-glucano, comprometendo a degradação da biomassa (LI et al., 2015), assim, a baixa incidência de arabinose hemicelulósica torna *S. polyrhiza* adequado para fins bioenergéticos.

As hemiceluloses são um grupo de polissacarídeos contendo ligações β -1,4-piranosil glicosídicas na cadeia principal para formar heteromananos, xiloglucanos, heteroxilanos e glucanos de ligação mista com diferentes combinações de arabinose, manose, xilose, fucose e glicose (O'NEILL e YORK, 2003; PAULY et al., 2013, DE SOUZA et al., 2013). Conforme mencionado anteriormente, o xiloglucano é a principal hemicelulose da lentilha-d'água (PAGLIUSO et al., 2018, SOWINSKI et al., 2019). Este polissacarídeo é composto por unidades repetitivas de quatro resíduos de β -D-glicosil, dos quais três contém α -D-xilosil na posição C-6, que pode se ramificar com galactose e fucose (FRY, 1989; SCHELLER e ULVSKOV, 2010). Assim, para sua síntese, são necessários os nucleotídeos-açúcares UDP-Glicose, UDP-Fucose, UDP-Galactose e UDP-Xilose. A UDP-Galactose é formada diretamente da UDP-Glicose através da UDP-glicose-4-epimerase (UGE, EC 5.1.3.2) (RÖSTI et al., 2007), e para o monômero de galactose, três enzimas são necessárias: UDP-açúcar pirofosforilase (USP, EC 2.7.7.64), UDP-glicose hexose 1-fosfato uridiltransferase (GALT, EC 2.7.7.12) e galactoquinase (GALK, EC 2.7.16) (FREY, 1996) (**Figura 1.1**). *UGE* pode ser considerado um gene vital para a síntese de xiloglucano e galactanos (GONDOLF et al., 2014). A superexpressão de *AtUGE2* em *A. thaliana* aumentou até 80% dos níveis de galactose da parede combinados com *GalS1* (galactano β -1,4-galactosiltransferase), que é uma fonte potencial de açúcar fermentável, o que beneficiaria a bioenergia (GONDOLF et al., 2014). Ainda, Zhang et al. (2020) encontraram uma relação entre a falta de

galactanos com a orientação das microfibrilas de celulose, o que interfere no crescimento do vegetal, demonstrando a necessidade de galactose na parede celular. O nível de galactose em *S. polyrhiza* foi de 22% da parede celular (74,8 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ AIR - **Tabela 1.1**). O processo de fracionamento demonstrou que galactose é encontrada principalmente como galactanos (oxalato de amônio - 17,4 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ parede celular -**Tabela 1.1**) e secundariamente como xiloglucanos (0,1-4M NaOH - **Tabela 1.1**). Portanto, a superexpressão de *SpUGE* pode ser favorável para a produção de biocombustíveis. Além disso, os resíduos de galactose são necessários no xiloglucano para resistência mecânica durante o crescimento em *A. thaliana* (PEÑA et al., 2004).

Os mananos são as hemiceluloses mais antigas sintetizadas com os nucleotídeos-açúcares GDP-manose, GDP-glicose e UDP-galactose (LECHAT et al., 2000; LIEPMAN et al., 2005). A via para a síntese de mananos descende diretamente da frutose-6-fosfato e envolve as enzimas manose-6-fosfato-isomerase (MPI, EC 5.3.1.8), fosfomanomutase (PMM, EC 5.4.2.8) e manose-1-fosfato-guanililtransferase (MGP, EC 2.7.7.13) (BONIN et al. 1997; BONIN e REITER 2000). Os mananos podem ocorrer como cadeias lineares de manose que podem ser intercaladas com glicose (glucomananos) e ramificadas com galactose (galactomananos) (BUCKERIDGE, 2010, VOINICIUC et al., 2019). Os polissacarídeos mananos representam 13,5% da parede celular de *S. polyrhiza* (43,9 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ AIR -**Table 1.2**). Um estudo de avaliação da ligação química dos polissacarídeos de parede em lentilha-d'água determinou que a manose é encontrada na forma de glucomananos (SOWINSKI et al., 2019). Devido à solubilidade desse polímero (FU et al., 2006; ZALEWSKI et al., 2015), a manose é encontrada principalmente nas frações de oxalato de amônio (6,2 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ parede celular) e clorito de sódio (3,40 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ parede celular) (**Tabela 1.1**). Além disso, os níveis dos transcritos relacionados aos mananos (*manose-6-fosfato-isomerase (SpMPI)*, *fosfomanomutase (SpPMM)*, *manose-1P-guanililtransferase (SpMGP)* e *glucomanano-4 β -manosiltransferase (SpCSLA)*) foram os mais elevados (**Tabela 1.2**). A via para a síntese de mananos tem um baixo número de cópias de genes, exceto para *glucomanano sintase (MSR)* e *glucomanano-4 β -manosiltransferase (CSLA)* com 21 e 16 parálogos, respectivamente (**APÊNDICE 1.1**). Conseqüentemente, a superexpressão dos precursores de manose (*manose-6-fosfato-isomerase (MPI)*, *fosfomanomutase*

(PMM) e manose-1P-guanililtransferase (MGP)), juntamente com glicosiltransferases envolvidas nesta montagem do polissacarídeo, podem aumentar o conteúdo de manose na parede celular de *S. polyrhiza*, o que poderia tornar esta planta uma fonte de nutrição e suplemento alimentar para a saúde humana (GARTI et al., 1997; NAKAYAMA et al., 2003; HU et al., 2016). Além disso, para a produção de biocombustíveis, o alto teor de manose pode aumentar a produção de etanol devido a sua fermentação relativamente eficiente por *S. cerevisiae* através da via Embden-Meyerhoff (VAN MARIS et al., 2006).

1.5. CONCLUSÃO

O levantamento dos dados obtidos neste capítulo contribuiu para a elucidação do metabolismo de polissacarídeos da parede celular e sua relevância para aplicações industriais. A via exemplificada de amido e dos nucleotídeos-açúcares apresentaram baixa redundância de cópia gênica. Os carboidratos de *S. polyrhiza* apresentam potencial para aplicações como adjuvantes, cosméticos, suplementos alimentares, agentes estabilizadores e gelificantes, como também como biocombustíveis. Os carboidratos não-estruturais podem ser rapidamente acumulados com alterações no sistema de cultivo, dispensando assim abordagens biomoleculares. Por outro lado, a parede celular poderia ser modificada para produzir mais galactose, manose e glicose, hexoses fermentadas prontamente. Simultaneamente, alguns genes relacionados à pectina podem ser reduzidos para facilitar sua conversão em bioprodutos.

O mapeamento realizado demonstra que *S. polyrhiza* pode ser relevante para futuras modificações genéticas capazes de tornar a biomassa mais apropriada para a produção de bioenergia. No entanto, qualquer mudança nas proporções dos polímeros da parede celular deve ser cuidadosamente planejada para avaliar os *trade-offs* entre os benefícios para a indústria e o desenvolvimento da planta.

1.6. REFERÊNCIAS

AHN, J. W. et al. Depletion of UDP-D-apiose/UDP-D-xylose synthases results in rhamnogalacturonan-II deficiency, cell wall thickening, and cell death in higher plants. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 19, p. 13708–13716, 12 maio

2006.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.

AMARAL, L. I. V. DO et al. **Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais** Hoehnea. [s.l: s.n.].

ARTICO, S. et al. Identification and evaluation of new reference genes in *Gossypium hirsutum* for accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data. **BMC Plant Biology**, v. 10, p. 49, 21 mar. 2010.

ATMODJO, M. A. et al. Galacturonosyltransferase (GAUT)1 and GAUT7 are the core of a plant cell wall pectin biosynthetic homogalacturonan:galacturonosyltransferase complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 50, p. 20225–20230, 13 dez. 2011.

AVCI, U.; PEÑA, M. J.; O'NEILL, M. A. Changes in the abundance of cell wall apiogalacturonan and xylogalacturonan and conservation of rhamnogalacturonan II structure during the diversification of the Lemnoideae. **Planta**, n. 0123456789, 2017.

BAR-PELED, M. et al. The synthesis and origin of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II - Insights from nucleotide sugar formation and diversity. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, n. MAY, p. 1–12, 11 maio 2012.

BAR-PELED, M.; O'NEILL, M. A. Plant Nucleotide Sugar Formation, Interconversion, and Salvage by Sugar Recycling*. **Annual Review of Plant Biology**, v. 62, n. 1, p. 127–155, 2 jun. 2011.

BAYRAKCI, A. G.; KOÇAR, G. Second-generation bioethanol production from water hyacinth and duckweed in Izmir: A case study. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 30, p. 306–316, 2014.

BETTIGA, M. et al. Arabinose and xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing a fungal pentose utilization pathway. **Microbial Cell Factories**, v. 8, n. 1, p. 40, 2009.

BONIN, C. P. et al. **The MUR1 Gene of Arabidopsis Thaliana Encodes an Isoform of GDP-D-mannose-4,6-dehydratase, Catalyzing the First Step in the de novo Synthesis of GDP-L-fucose** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, , 1997. Disponível em: <<https://www.jstor.org/stable/41590>>. Acesso em: 14 abr. 2020

BONIN, C. P.; REITER, W. D. A bifunctional epimerase-reductase acts downstream of the MUR1 gene product and completes the de novo synthesis of GDP-L-fucose in Arabidopsis. **The Plant journal: for cell and molecular biology**, v. 21, n. 5, p. 445–54, mar. 2000.

BRUNNER, A. M.; YAKOVLEV, I. A.; STRAUSS, S. H. Validating internal controls

for quantitative plant gene expression studies. **BMC Plant Biology**, v. 4, p. 14, 18 ago. 2004.

BUCKERIDGE, M. S. Seed Cell Wall Storage Polysaccharides: Models to Understand Cell Wall Biosynthesis and Degradation. **Plant Physiology**, v. 154, n. 3, p. 1017–23, 1 nov. 2010.

BUCKERIDGE, M. S. The evolution of the Glycomic Codes of extracellular matrices. **BioSystems**, v. 164, p. 112–120, 1 fev. 2017.

BURTON, R. A.; FINCHER, G. B. **Plant cell wall engineering: Applications in biofuel production and improved human health** *Current Opinion in Biotechnology* Elsevier Ltd, , 1 abr. 2014.

BURTON, R. A.; GIDLEY, M. J.; FINCHER, G. B. Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. **Nature Chemical Biology**, v. 6, n. 10, p. 724–732, 2010.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 1 abr. 2009.

CAFFALL, K. H.; MOHNEN, D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 14, p. 1879–1900, 2009.

CARPITA, N. C. Fractionation of hemicelluloses from maize cell walls with increasing concentrations of alkali. **Phytochemistry**, v. 23, n. 5, p. 1089–1093, 1984.

CARPITA, N. C. Update on Mechanisms of Plant Cell Wall Biosynthesis: How Plants Make Cellulose and Other (1->4)-D-Glycans. **Plant Physiology**, v. 155, n. 1, p. 171–184, 2011.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. 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**, v. 3, n. 1, p. 1–30, 1993.

CARPITA, N.; TIERNEY, M.; CAMPBELL, M. Molecular biology of the plant cell wall: searching for the genes that define structure, architecture and dynamics. **Plant Cell Walls**, v. 47, p. 1–5, 2001.

CESCHIN, S.; CRESCENZI, M.; IANNELLI, M. A. Phytoremediation potential of the duckweeds *Lemna minuta* and *Lemna minor* to remove nutrients from treated waters. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1–9, 22 fev. 2020.

CHAPIN, F. S.; SCHULZE, E.-D.; MOONEY, H. A. **THE ECOLOGY AND ECONOMICS OF STORAGE IN PLANTS** *Annu. Rev. Ecol Syst.* [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.annualreviews.org/aronline>. Acesso em: 14 abr. 2020.

CHÁVEZ MONTES, R. A. et al. Cell wall modifications in *Arabidopsis* plants with altered α -l-arabinofuranosidase activity. **Plant Physiology**, v. 147, n. 1, p. 63–

67, 1 maio 2008.

CHOI, H. J. et al. Inhibitory effects of quercetin 3-rhamnoside on influenza A virus replication. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3–4, p. 329–333, 28 jun. 2009.

COSGROVE, D. J. Diffuse Growth of Plant Cell Walls 1 [OPEN]. v. 176, n. January, p. 16–27, 2018.

CRUZ, F. et al. Evaluation of coffee reference genes for relative expression studies by quantitative real-time RT-PCR. **Molecular Breeding**, v. 23, n. 4, p. 607–616, 3 maio 2009.

CZECHOWSKI, T. et al. **Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in arabidopsis** *Plant Physiology* American Society of Plant Biologists, , 1 set. 2005.

DADI, A. P.; SCHALL, C. A.; VARANASI, S. **Mitigation of cellulose recalcitrance to enzymatic hydrolysis by ionic liquid pretreatment**. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **Anais...**abr. 2007

DE VEGA-BARTOL, J. J. et al. Normalizing gene expression by quantitative PCR during somatic embryogenesis in two representative conifer species: *Pinus pinaster* and *Picea abies*. **Plant Cell Reports**, v. 32, n. 5, p. 715–729, maio 2013.

DIET, A. et al. The Arabidopsis root hair cell wall formation mutant *lrx1* is suppressed by mutations in the *RHM1* gene encoding a UDP-L-Rhamnose synthase. **Plant Cell**, v. 18, n. 7, p. 1630–1641, jul. 2006.

ELBL, P. et al. Identification and evaluation of reference genes for quantitative analysis of brazilian pine (*Araucaria angustifolia* Bertol. Kuntze) gene expression. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–15, 2015.

EXPÓSITO-RODRÍGUEZ, M. et al. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. **BMC Plant Biology**, v. 8, p. 1–12, 2008.

FILBRY, A. et al. **Cosmetic or dermatological preparations for skin care and cleaning, containing apiogalacturonan compounds or extracts thereof from seaweed, together with emulsifiers** Germany, 13 jul. 2007.

FREY, P. A. The Leloir pathway: a mechanistic imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose. **The FASEB Journal**, v. 10, n. 4, p. 461–470, 1996.

FRY, S. C. The structure and function of xyloglucan. **Journal of Experimental Botany**, v. 40, n. 210, p. 1–11, 1989.

FU, Y. et al. **Preparation of fast-dissolving tablets based on Mannose**. ACS Symposium Series. **Anais...**2006

GARTI, N. et al. Fenugreek galactomannans as food emulsifiers. **LWT - Food**

Science and Technology, v. 30, n. 3, p. 305–311, 1 maio 1997.

GE, X. et al. Growing Lemna minor in agricultural wastewater and converting the duckweed biomass to ethanol. **Bioresource Technology**, v. 124, p. 485–488, nov. 2012.

GIBEAUT, D. M.; CARPITA, N. C. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides. **FASEB Journal**, v. 8, n. 12, p. 904–915, 1994.

GILBERT, H. J. The biochemistry and structural biology of plant cell wall deconstruction. **Plant Physiology**, v. 153, n. 2, p. 444–55, 1 jun. 2010.

GONDOLF, V. M. et al. A gene stacking approach leads to engineered plants with highly increased galactan levels in Arabidopsis. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 1, p. 344, 10 dez. 2014.

GORSHKOVA, T. A. et al. Cell-Wall Polysaccharides of Developing Flax Plants. **Plant Physiology**, v. 114, p. 721–729, 1996.

GU, X.; BAR-PELED, M. The biosynthesis of UDP-galacturonic acid in plants. Functional cloning and characterization of Arabidopsis UDP-D-glucuronic acid 4-epimerase. **Plant physiology**, v. 136, n. 4, p. 4256–4264, 2004.

HARRIS, D. M. et al. Cellulose microfibril crystallinity is reduced by mutating C-terminal transmembrane region residues CESA1 A903V and CESA3 T942I of cellulose synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 11, p. 4098–4103, 13 mar. 2012.

HARRIS, D.; STORK, J.; DEBOLT, S. Genetic modification in cellulose-synthase reduces crystallinity and improves biochemical conversion to fermentable sugar. **GCB Bioenergy**, v. 1, n. 1, p. 51–61, 1 fev. 2009.

HENRY CHRISTOPHER, J. VAN R.; VAN DEN ENDE, W. UDP-glucose: A potential signaling molecule in plants? **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. 1, p. 6–11, 2018.

HILLMAN, W. S.; CULLEY JR., D. D. The Uses of Duckweed: The rapid growth, nutritional value, and high biomass productivity of these floating plants suggest their use in water treatment, as feed crops, and in energy-efficient farming. **American Scientist**, v. 66, n. 4, p. 442–451, 1978.

HIMMEL, M. E. **Biomass Recalcitrance: Deconstructing the Plant Cell Wall for Bioenergy**. [s.l.] Blackwell Publishing Ltd., 2009.

HOCH, G.; RICHTER, A.; KÖRNER, C. Non-structural carbon compounds in temperate forest trees. **Cell**, p. 1067–1081, 2003.

HU, R. et al. Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR. **BMC Molecular Biology**, v. 10, n. 1, p. 93, 28 set. 2009.

HU, X. et al. **α-D-Mannose: Properties, Production, and Applications:**

An Overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 4, p. 773–785, 1 jul. 2016.

ISKANDAR, H. M. et al. **Comparison of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression in sugarcane** *Plant Molecular Biology Reporter* International Society for Plant Molecular Biology, , 3 set. 2004.

JANG, J. C. et al. Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. **Plant Cell**, v. 9, n. 1, p. 5–19, 1997.

JENKINS, D. J. A. et al. EFFECT OF PECTIN, GUAR GUM, AND WHEAT FIBRE ON SERUM-CHOLESTEROL. **The Lancet**, v. 305, n. 7916, p. 1116–1117, 17 maio 1975.

JENKINS, D. J. A. et al. Decrease in postprandial insulin and glucose concentration by guar and pectin. **Annals of Internal Medicine**, v. 86, n. 1, p. 20–23, 1 jan. 1977.

KALLURI, U. C.; KELLER, M. Bioenergy research: a new paradigm in multidisciplinary research. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 7, n. 51, p. 1391–1401, 6 out. 2010.

KARHUMAA, K. et al. Comparison of the xylose reductase-xylitol dehydrogenase and the xylose isomerase pathways for xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, v. 6, n. 1, p. 1–10, 5 fev. 2007.

KLECZKOWSKI, L. A.; KUNZ, S.; WILCZYNSKA, M. Mechanisms of UDP-glucose synthesis in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 29, n. 4, p. 191–203, 2010.

KOCH, K. Sucrose metabolism: Regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, n. 3, p. 235–246, 2004.

KÖRNER, S.; VERMAAT, J. E.; VEENSTRA, S. The Capacity of Duckweed to Treat Wastewater. **Journal of Environmental Quality**, v. 32, n. 5, p. 1583–1590, 1 set. 2003.

KÖTTER, P.; CIRIACY, M. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 6, p. 776–783, mar. 1993.

KUANG, B. et al. Role of UDP-Glucuronic Acid Decarboxylase in Xylan Biosynthesis in *Arabidopsis*. **Molecular Plant**, v. 9, n. 8, p. 1119–1131, 1 ago. 2016.

LANDOLT, E. **Lemnaceae Duckweed Family** *Journal of the Arizona-Nevada academy of science*, 1992.

LECHAT, H. et al. STRUCTURE AND DISTRIBUTION OF GLUCOMANNAN AND SULFATED GLUCAN IN THE CELL WALLS OF THE RED ALGA

KAPPAPHYCUS ALVAREZII Two new polysaccharides were isolated from the cell walls of the carrageenan producing red seaweed *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty. v. 902, p. 891–902, 2000.

LECLERE, L.; CUTSEM, P. VAN; MICHIELS, C. Anti-cancer activities of pH- or heat-modified pectin. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4 OCT, n. March 2014, p. 128, 8 out. 2013.

LEE, S. H. et al. Molecular characteristics and anti-inflammatory activity of the fucoidan extracted from *Ecklonia cava*. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 2, p. 599–606, 20 jun. 2012.

LEI, L.; LI, S.; GU, Y. Cellulose synthase complexes: Composition and regulation. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, n. APR, p. 1–6, 17 abr. 2012.

LI, F. et al. High-level hemicellulosic arabinose predominately affects lignocellulose crystallinity for genetically enhancing both plant lodging resistance and biomass enzymatic digestibility in rice mutants. **Plant Biotechnology Journal**, v. 13, n. 4, p. 514–525, 1 maio 2015.

LIEPMAN, A. H.; WILKERSON, C. G.; KEEGSTRA, K. 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**, v. 102, n. 6, p. 2221–2226, 8 fev. 2005.

LIONETTI, V. et al. Engineering the cell wall by reducing de-methyl-esterified homogalacturonan improves saccharification of plant tissues for bioconversion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 2, p. 616–621, 2010.

LIU, W. et al. IBS: an illustrator for the presentation and visualization of biological sequences. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 31, n. 20, p. 3359–61, 15 out. 2015.

LONGLAND, J. M.; FRY, S. C.; TREWAVAS, A. J. Developmental Control of Apiogalacturonan Biosynthesis and UDP-Apiose Production in a Duckweed. **Plant physiology**, v. 90, n. 3, p. 972–976, jul. 1989.

MAFRA, V. et al. Reference Genes for Accurate Transcript Normalization in Citrus Genotypes under Different Experimental Conditions. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e31263, 9 fev. 2012.

MCQUEEN-MASON, S.; COSGROVE, D. J. Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. v. 91, n. July, p. 6574–6578, 1994.

MICHAEL, T. P. et al. Comprehensive definition of genome features in *Spirodela polyrhiza* by high-depth physical mapping and short-read DNA sequencing strategies. **Plant Journal**, v. 89, n. 3, p. 617–635, 1 fev. 2017.

MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 3, p. 266–277, jun. 2008.

MØLHØJ, M.; VERMA, R.; REITER, W. D. The biosynthesis of D-galacturonate in plants. Functional cloning and characterization of a membrane-anchored UDP-D-glucuronate 4-epimerase from arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 135, n. 3, p. 1221–1230, 2004.

MOYSÉS, D. N. et al. Xylose fermentation by *saccharomyces cerevisiae*: Challenges and prospects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 1–18, 25 fev. 2016.

NAKAYAMA, K. I.; MAEDA, Y.; JIGAMI, Y. Interaction of GDP-4-keto-6-deoxymannose-3,5-epimerase-4-reductase with GDP-mannose-4,6-dehydratase stabilizes the enzyme activity for formation of GDP-fucose from GDP-mannose. **Glycobiology**, v. 13, n. 10, p. 673–680, 2003.

NARSAI, R. et al. Defining reference genes in *Oryza sativa* using organ, development, biotic and abiotic transcriptome datasets. **BMC Plant Biology**, v. 10, p. 56, 31 mar. 2010.

O'NEILL, M. A.; YORK, W. S. The Composition and Structure of Plant Primary Cell Walls. **Annual Plant Reviews online**, v. 8, p. 1–54, 19 abr. 2003.

ORON, G. Duckweed culture for wastewater renovation and biomass production. **Agricultural Water Management**, v. 26, n. 1–2, p. 27–40, 1994.

ORON, G.; WILDSCHUT, L. R.; PORATH, D. Waste water recycling by duckweed for protein production and effluent renovation. **Water Science and Technology**, v. 17, n. 4-5–5 pt 2, p. 803–817, 1 abr. 1985.

PAGEON, H. et al. Potentially beneficial effects of rhamnose on skin ageing: an *in vitro* and *in vivo* study. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 41, n. 3, p. 213–220, 6 jun. 2019.

PAGLIUSO, D. et al. Correlation of apiose levels and growth rates in duckweeds. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, n. JUL, p. 1–10, 2018.

PAULY, M. et al. Hemicellulose biosynthesis. **Planta**, v. 238, n. 4, p. 627–642, 2013.

PEÑA, M. J. et al. The Galactose Residues of Xyloglucan Are Essential to Maintain Mechanical Strength of the Primary Cell Walls in Arabidopsis during Growth. **Plant Physiology**, v. 134, n. 1, p. 443–451, 1 jan. 2004.

PERINI, P. et al. Reference genes for transcriptional analysis of flowering and fruit ripening stages in apple (*Malus x domestica* Borkh.). **Molecular Breeding**, v. 34, n. 3, p. 829–842, 30 mar. 2014.

POGORELKO, G. et al. Cell wall integrity: Targeted post-synthetic modifications to reveal its role in plant growth and defense against pathogens. **Plant Signaling & Behavior**, v. 8, n. 9, p. e25435, set. 2013.

POPOV, S. V.; OVODOV, Y. S. Polypotency of the immunomodulatory effect of pectins. **Biochemistry (Moscow)**, v. 78, n. 7, p. 823–835, 13 jul. 2013.

POPOV, S. V et al. Adjuvant effect of lemnan, pectic polysaccharide of callus culture of *Lemna minor* L. at oral administration. **ImmunoPharmacology and Immunotoxicology**, v. 28, n. 1, p. 141–152, 2006.

POPPER, Z. A.; FRY, S. C. Primary cell wall composition of pteridophytes and spermatophytes. **New Phytologist**, v. 164, n. 1, p. 165–174, 22 jul. 2004.

QUENTIN, A. G. et al. Non-structural carbohydrates in woody plants compared among laboratories. **Tree Physiology**, v. 35, n. 11, p. 1146–1165, 2015.

RAMOS DO PRADO, S. B. et al. Ripening-induced chemical modifications of papaya pectin inhibit cancer cell proliferation OPEN. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–17, 2017.

RAUTENGARTEN, C. et al. The elaborate route for UDP-arabinose delivery into the Golgi of plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 16, p. 4261–4266, 18 abr. 2017.

REITER, W.-D.; CHAPPLE, C.; SOMERVILLE, C. R. Mutants of *Arabidopsis thaliana* with altered cell wall polysaccharide composition. **The Plant Journal**, v. 12, n. 2, p. 335–345, 1 ago. 1997.

REITER, W. D.; VANZIN, G. F. Molecular genetics of nucleotide sugar interconversion pathways in plants. **Plant Molecular Biology**, v. 47, n. 1–2, p. 95–113, 2001.

RENNIE, E. A.; SCHELLER, H. V. Xylan biosynthesis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 100–107, 2014.

REUHS, B. L. et al. L-galactose replaces L-fucose in the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II synthesized by the L-fucose-deficient *mur1* *Arabidopsis* mutant. **Planta**, v. 219, n. 1, p. 147–157, 26 maio 2004.

RHO, H. S. et al. Kaempferol and kaempferol rhamnosides with depigmenting and anti-inflammatory properties. **Molecules**, v. 16, n. 4, p. 3338–3344, abr. 2011.

RÖSTI, J. et al. UDP-glucose 4-epimerase isoforms UGE2 and UGE4 cooperate in providing UDP-galactose for cell wall biosynthesis and growth of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell**, v. 19, n. 5, p. 1565–1579, 2007.

SAFFER, A. M.; CARPITA, N. C.; IRISH, V. F. Rhamnose-Containing Cell Wall Polymers Suppress Helical Plant Growth Independently of Microtubule Orientation. **Current Biology**, v. 27, n. 15, p. 2248–2259.e4, 7 ago. 2017.

SALMAN, H. et al. Citrus pectin affects cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 62, n. 9, p. 579–582, 1 nov. 2008.

SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 263–289, 2010.

SCHÜRCH, C.; BLUM, P.; ZÜLLI, F. **Potential of plant cells in culture for cosmetic application**. *Phytochemistry Reviews*. **Anais...**Springer, 1 out. 2008

SEIFERT, G. J. Nucleotide sugar interconversions and cell wall biosynthesis: How to bring the inside to the outside. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, n. 3, p. 277–284, 2004.

SILVA, G. B. et al. Cell wall polysaccharides from fern leaves: Evidence for a mannan-rich Type III cell wall in *Adiantum raddianum*. **Phytochemistry**, v. 72, n. 18, p. 2352–2360, dez. 2011.

SMITH, A. M.; KRUGER, N. J.; LUNN, J. E. Source of sugar nucleotides for starch and cellulose synthesis. **Pnas**, v. 109, n. 14, p. E776, 2012.

SMITH, A. M.; STITT, M. Coordination of carbon supply and plant growth. **Plant, Cell and Environment**, v. 30, n. 9, p. 1126–1149, 2007.

SODA, S. et al. Duckweed biomass as a renewable biorefinery feedstock: Ethanol and succinate production from *Wolffia globosa*. **Biomass and Bioenergy**, v. 81, p. 364–368, 2015a.

SODA, S. et al. Duckweed biomass as a renewable biorefinery feedstock: Ethanol and succinate production from *Wolffia globosa*. **Biomass and Bioenergy**, v. 81, p. 364–368, 1 out. 2015b.

SOMERVILLE, C. et al. Toward a systems approach to understanding plant cell walls. **Science**, v. 306, n. 5705, p. 2206–2211, 24 dez. 2004.

SOMERVILLE, C. Cellulose Synthesis in Higher Plants. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 22, p. 53–78, 2006.

SOWINSKI, E. E. et al. Linkage structure of cell-wall polysaccharides from three duckweed species. **Carbohydrate Polymers**, v. 223, n. July, p. 115119, 2019.

STERLING, J. D. et al. Functional identification of an *Arabidopsis* pectin biosynthetic homogalacturonan galacturonosyltransferase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 13, p. 5236–5241, 28 mar. 2006.

STURM, A.; TANG, G. Plants Are Crucial for Development ,. **October**, v. 4, n. 10, p. 401–407, 1999.

SU, H. et al. Use of duckweed (*Landoltia punctata*) as a fermentation substrate for the production of higher alcohols as biofuels. **Energy and Fuels**, v. 28, n. 5, p. 3206–3216, 15 maio 2014.

TAO, X. et al. Comparative transcriptome analysis to investigate the high starch accumulation of duckweed (*Landoltia punctata*) under nutrient starvation. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 72, 8 maio 2013.

TAVARES, E. Q. P. P.; DE SOUZA, A. P.; BUCKERIDGE, M. S. How endogenous plant cell-wall degradation mechanisms can help achieve higher

efficiency in saccharification of biomass. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 14, p. 4133–4143, jul. 2015.

TOMSIK, P. et al. L-rhamnose and L-fucose suppress cancer growth in mice. **Central European Journal of Biology**, v. 6, n. 1, p. 1–9, 2011.

VAN MARIS, A. J. A. A. et al. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: Current status. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 90, n. 4, p. 391–418, nov. 2006.

VANDESOMPELE, J. et al. **Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://genomebiology.com/2002/3/7/research/0034.1>> Correspondence: rankSpeleman.>. Acesso em: 15 abr. 2020.

VERBANČIČ, J. et al. Carbon supply and the regulation of cell wall synthesis. **Molecular Plant**, v. 11, n. January, p. 75–94, 2017.

VOINICIUC, C. et al. Mechanistic insights from plant heteromannan synthesis in yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 2, p. 522–527, 2019.

WALDRON, K. W.; PARKER, M. L.; SMITH, A. C. Plant Cell Walls and Food Quality. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, n. 4, p. 128–146, out. 2003.

WANG, J. et al. Overexpression of a cytosol-localized rhamnose biosynthesis protein encoded by *Arabidopsis* RHM1 gene increases rhamnose content in cell wall. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 2, p. 86–93, 1 fev. 2009.

WANG, W.; WU, Y.; MESSING, J. RNA-Seq transcriptome analysis of *Spirodela* dormancy without reproduction. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 60, jan. 2014.

WOLFE, D. et al. Visualizing genomic information across chromosomes with PhenoGram. **BioData Mining**, v. 6, n. 1, p. 18, 16 dez. 2013.

XIA, J.; WISHART, D. S. Using metaboanalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 2016, p. 14.10.1-14.10.91, 2016.

XIAO, Y. et al. Culturing duckweed in the field for starch accumulation. **Industrial Crops and Products**, v. 48, n. October 2015, p. 183–190, 2013.

YADAV, D. et al. An assessment of duckweed as a potential lignocellulosic feedstock for biogas production. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 119, p. 253–259, 1 abr. 2017.

YANG, T. et al. Identification of galacturonic acid-1-phosphate kinase, a new member of the GHMP kinase superfamily in plants, and comparison with galactose-1-phosphate kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 32,

p. 21526–21535, 7 ago. 2009.

YIN, Y. et al. The influence of light intensity and photoperiod on duckweed biomass and starch accumulation for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 187, p. 84–90, 2015.

YORK, W. S.; O'NEILL, M. A. **Biochemical control of xylan biosynthesis - which end is up?** *Current Opinion in Plant Biology* Elsevier Current Trends, , 1 jun. 2008.

YU, C. et al. Integrated analysis of transcriptome and metabolites reveals an essential role of metabolic flux in starch accumulation under nitrogen starvation in duckweed. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 167, 26 dez. 2017.

ZALEWSKI, B. M.; CHMIELEWSKA, A.; SZAJEWSKA, H. **The effect of glucomannan on body weight in overweight or obese children and adults: A systematic review of randomized controlled trials** *Nutrition* Elsevier Inc., , 1 mar. 2015.

ZEEMAN, S. C.; SMITH, S. M.; SMITH, A. M. The diurnal metabolism of leaf starch. **Biochemical Journal**, v. 401, n. 1, p. 13–28, 2007.

ZHANG, R. et al. A novel rice fragile culm 24 mutant encodes a UDP-glucose epimerase that affects cell wall properties and photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, n. February, p. 1–14, 2020.

ZHANG, W.; XU, P.; ZHANG, H. **Pectin in cancer therapy: A review** *Trends in Food Science and Technology* Elsevier Ltd, , 1 ago. 2015.

ZHAO, X. et al. Chemical characterisation and analysis of the cell wall polysaccharides of duckweed (*Lemna minor*). **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 410–418, 13 out. 2014.

ZHAO, X. et al. UDP-Api/UDP-Xyl synthases affect plant development by controlling the content of UDP-Api to regulate the RG-II-borate complex. **The Plant Journal**, p. 1–16, 2020.

ZIRSCHKY, J.; REED, S. C. The Use of Duckweed for Wastewater Treatment. . 1988, p. 1253–1258.

CAPÍTULO II

MAPEAMENTO DO GENOMA E DE NUCLEOTÍDEOS- AÇÚCARES NA FORMAÇÃO DA PAREDE CELULAR DE *Lemna* *minor* 8627

Colaboradores: Dr. Eric Lam, Dr. Robert Martienssen, Kenneth Acosta, Dra. Maria Magdalena Rossi, Dr. Bruno Lira

2.1. INTRODUÇÃO

As características de crescimento acelerado e estabilidade das culturas de lentilhas d'água fizeram dessas plantas modelos interessantes na década de 50 a 90 (VU et al., 2020). Dentre as 37 espécies de lentilhas d'água (*Lemnaceae*) as espécies do gênero *Lemna*, em especial *Lemna minor* foi a mais estudada, a qual contribuiu para a elucidação do controle do fotoperíodo na floração e na via de síntese de auxina e assimilação de enxofre (BRUCE; MALKIN, 1991; CEDERGREEN; MADSEN, 2002; MAENG; KHUDAIRI, 1973; MOON; STOMP, 1997; VAN HOECK et al., 2015). Ainda, a distribuição global e a tolerância a diversos contaminantes permitiram que espécies do gênero *Lemna* fossem empregados em avaliações ecotoxicológicas e a padronização de testes de crescimento inibitório (OECD, 2006).

A compreensão dos mecanismos de sobrevivência dessas plantas à diversos ambientes, como também sua adaptação, crescimento e reprodução apresentam grande potencial de definição de genes alvo das vias metabólicas. Neste sentido há alguns genomas já sequenciados, como por exemplo de *Spirodela polyrhiza* 7498 e 9509, *Spirodela intermedia* 7747 e 8410, *Lemna minor* 8627 e 5500, *Lemna gibba* 7742 e *Wolffia australiana* 8730 (ERNEST, 2016; HOANG et al., 2020; MICHAEL et al., 2017; VAN HOECK et al., 2015; WANG; WU; MESSING, 2014), que podem ser utilizados para consulta. Contudo, os genomas de *Lemna* estão depositados no repositório Lemna.org e não estão disponíveis ao público.

O genoma de *Lemna minor* 8627 apresenta duas vezes o tamanho da linhagem 5500 e cinco vezes o tamanho de *Spirodela polyrhiza* 7498 (158 Mb) (AN et al., 2018). Acredita-se que a divergência entre os tamanhos e as duplicações gênicas entre as espécies de *Lemna* se deva a um evento recente de duplicação completa do genoma, em que levou à segregação de *Lemna* e *Spirodela*, bem como os diferentes graus de remoção de genes duplicados (AN et al., 2018). Essa distinção entre as espécies e gêneros é interessante para avaliar vias metabólicas específicas no nível molecular e bioquímico para compreensão sistêmica. *Lemna minor* ainda apresenta elevado potencial obtenção de alvos, uma vez que a espécie apresenta um método já estabelecido

para transformação genética (CANTÓ-PASTOR et al., 2015; CEDERGREEN; MADSEN, 2002; YAMAMOTO et al., 2001)

A parede celular das lentilhas d'água apresenta polissacarídeos pécticos únicos e complexos (AVCI; PEÑA; O'NEILL, 2018; LONGLAND; FRY; TREWAVAS, 1989) e uma plasticidade de alterar a composição dessas estruturas (PAGLIUSO et al., 2018), tornando-as foco em estudos biotecnológicos. A parede celular de plantas é uma estrutura formada por polissacarídeos, compostos fenólicos e proteínas em que os polissacarídeos estão organizados em microfibrilas de celulose, interligadas às hemiceluloses e imersas em uma matriz de pectinas (BUCKERIDGE, 2017). A parede primária é formada por 90% de polissacarídeos (CAFFALL; MOHNEN, 2009) que são sintetizados a partir de moléculas doadoras de monossacarídeos na via dos nucleotídeos-açúcares (**Capítulo I – Figura 1.1**) (VERBANČIČ et al., 2017). Os nucleotídeos-açúcares são sintetizados a partir da via UDP-glicose oriunda da assimilação de carbono através da fotossíntese e redução do carbono em trioses-fosfato (VERBANČIČ et al., 2017). Os polissacarídeos de parede são sintetizados a partir de diversos difosfato-nucleotídeos (NDP) e a atividade de várias glicosiltransferases (GT), as quais transferem o açúcar da forma fosforilada para um receptor de glucano formando cadeias unidas por ligações glicosídicas (BAR-PELED; O'NEILL, 2011). Esse processo de síntese ocorre no complexo de Golgi (para hemiceluloses e pectinas), que quando o polissacarídeo está finalizado é exportado por vesículas trans-Golgi-net para o externo da membrana plasmática se ancorando as microfibrilas de celulose (GIBEAUT; CARPITA, 1994). Estas microfibrilas são sintetizados por complexos (CSC) localizados na própria membrana plasmática (SOMERVILLE, 2006). Portanto, elucidando a via dos nucleotídeos-açúcares é possível apontar alvos relacionados a síntese de parede de lentilhas d'água e suas potenciais aplicações na área de cosmética, alimentícia, farmácia, bioenergia e biomateriais.

2.2. OBJETIVOS

O objetivo deste capítulo consistiu em mapear os genes da via dos nucleotídeos-açúcares de *Lemna minor* 8627 com o intuito de compará-los com de *Spirodela polyrhiza*.

2.3. MATERIAL E MÉTODOS

Como alternativa a *S. polyrhiza*, os alvos de *L. minor* da via de nucleotídeos-açúcares também foram localizados e as mesmas buscas foram realizadas conforme descritas no **Capítulo I**. A utilização de *L. minor* foi necessária devido a maior capacidade de transformação genética (cultura de tecidos e protocolo reprodutível) como serão apresentadas nos **Capítulos III e IV**.

2.3.1. Levantamento de genes de nucleotídeos-açúcares

A via do estudo apresentada no **Capítulo I (Figura 1.1.)** e os 36 alvos envolvidos na síntese de amido e dos nucleotídeos-açúcares foram selecionados para identificação de ortólogos em *L. minor* 8627.

O *draft* do genoma de *L. minor* 8627 está depositado no bando de dados lemna.org, o qual consiste em montagens e anotações preliminares de genomas de *Lemnaceae* pelo *Cold Spring Harbor Laboratory* (CSHL) sob responsabilidade do Dr. Robert Martienssen. Como o banco é restrito e não foi publicado na íntegra, foi necessária a autorização e colaboração do Dr. Robert Martienssen, Dr. Eric Lam e Kenneth Acosta (Lam laboratory, Rutgers University, USA) para a obtenção desses dados.

As sequências de aminoácidos curadas dos alvos de *S. polyrhiza* 7498 e *A. thaliana* foram usadas como *query* contra o genoma e proteoma de *L. minor* 8627 (201904v2) e pelas ferramentas Orthofinder 2.3.1 (EMMS; KELLY, 2015) e Blastp para a recuperação de sequências correspondentes em *L. minor* com melhores *BitScores*. As sequências de proteínas homólogas obtidas foram anotadas e classificadas usando HMMER Scan (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/>).

A distribuição física entre os 42 cromossomos foi determinada com base em dados recuperados do Orthofinder 2.3.1, e o ideograma cromossômico dos genes da via de nucleotídeos-açúcares foi projetado pelo software PhenoGram (<https://ritchielab.org/software/phenogram-downloads>) (WOLFE et al., 2013).

2.3.2. Identificação de possíveis parálogos

Alinhamentos múltiplos foram realizados usando o software M-Coffee (<http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/do:mcoffee>) de sequências de aminoácidos de *S. polyrhiza*, *L. minor* e *A. thaliana* para cada um dos 36 alvos da via dos

nucleotídeo-açúcares avaliados no **Capítulo I**. O alinhamento das proteínas foi submetido à análise “filogenética” para cada um dos alvos através do software IQTREE (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>) (TRIFINOPOULOS et al., 2016) pela reconstrução de *maximum likelihood*, com o modelo JTT, nos parâmetros de gama e proporção de sítios invariáveis 4; perturbação de 0,5; coeficiente de correlação mínima de 0.99 e interações máximas de 1000 e os ramos (*branch*) foram calculados pelo teste de razão de verossimilhança aproximada de Shimodaira-Hasegawa (SH.aLTR).

O grafo da árvore filogenética gerada foi realizado através do software ITOL (<https://itol.embl.de/>) (LETUNIC; BORK, 2021). Clados e sub-clados foram analisados para a possível identificação de parálogos.

2.3.3. Desenho de iniciadores

Para o desenho de iniciadores, regiões conservadas precisaram ser selecionadas e para tanto, novos alinhamentos foram realizados com as sequências de nucleotídeos de *L. minor* 8627 dos sub-clados pelo software Clustal Omega (Bioedit). Os iniciadores foram desenhados com a ferramenta *Primer-Blast*® (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/iniciadores-blast/>) de acordo com os seguintes parâmetros: $57\text{ °C} \leq T_m \text{ (iniciador)} \leq 63\text{ °C}$; $30\% \leq CG \leq 80\%$; $18\text{ pb} \leq \text{tamanho iniciador} \leq 27\text{ pb}$; $100\text{ pb} \leq \text{tamanho amplicon} \leq 350\text{ pb}$; $0\text{ °C} \leq T_m \text{ do amplicon} \leq 85\text{ °C}$. Os iniciadores desenhados foram analisados em relação a estrutura pelo programa Oligo Analyzer Tool (Integrated DNA Technologies) (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer/>) e selecionados seguindo os parâmetros: $40\text{ °C} \leq \textit{hairpin}$; $0 \leq \textit{pareamento self-dimer} \leq 3$ e $0 \leq \textit{pareamento hetero-dimer} \leq 4$. Os pares de oligonucleotídeos desenhados para cada gene estão apresentados no **Apêndice 2.1**. Os iniciadores (Exxtend-<https://www.exxtend.com.br/>) foram recebidos na forma liofilizada, na qual eles foram ressuspensos em Tris 10 mM EDTA 1 mM pH 7,0 (Thermo Scientific) para concentração final de 100 μM e armazenados à -20 °C .

2.3.4. Material vegetal

Lemna minor 8627 originária da Dinamarca (Sjaelland, Copenhagen, Slangerup) foi adquirida da Rutgers Duckweed Stock Cooperative (RDSC). As plantas foram cultivadas axenicamente em 250 mL de meio $\frac{1}{2}$ Schenck-

Hildebrandt (Sigma-Aldrich) suplementado com 0,5% de sacarose e mantidas a 25 °C, com fotoperíodo de 16h luz / 8h escuro com uma intensidade de luz de 20 $\mu\text{mols.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

2.3.5. Extração de RNA, tratamento com DNase e síntese de cDNA

Para as análises de expressão gênica foi necessária a extração de material genético codificante (RNA), o qual foi realizada com 20 mg de material vegetal após 10 dias de cultivo, homogeneizado com nitrogênio líquido no kit *ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System* (Promega®) e seguido pelo tratamento com DNase conforme instruções do fabricante. A quantificação e pureza do RNA foram garantidas usando um espectrofotômetro Nanodrop ND-100 (Thermo Scientific®) e amostras com razões 260/280 entre 1,8 e 2,2 foram utilizadas. A integridade das amostras também foi assegurada por eletroforese em gel de agarose a 1% e corada com gel de coloração SYBR Safe DNA (1771581, Thermo Scientific).

Aproximadamente 1 μg de cada amostra de mRNA foi submetido a transcrição reversa com 50 μM oligo DT; 1mM dNTP; 2,5 mM MgCl_2 , 10 mM dTT, 40 U *RNAseOUT*, 200 U *SuperScript III Reverse Transcriptase* e 30 U *RNAse H*, seguindo as especificações do fabricante (Invitrogen Life Technologies). O cDNA adquirido foi testado quanto à ausência de DNA genômico por reação de PCR e o produto obtido foi revelado por eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR Safe (Thermo Scientific).

2.3.6. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O teste dos oligonucleotídeos e à amplificação dos genes alvos se deu por meio de amplificação por PCR. O sistema de amplificação foi em 1U *GoTaq DNA Polimerase* (Promega); 0,2 mM dNTPs (Invitrogen Life Technologies); 0,2 μM iniciador e tampão enzima 1X em 25 μL de reação. O programa de amplificação iniciou-se com 2 minutos de incubação à 95 °C, seguido de 30 ciclos de incubação à 95 °C por 30 s, anelamento dos iniciadores à 60 °C por 30 s e extensão à 72 °C por 45 s. Em seguida deu-se a extensão final a 72 °C por 5 min. O produto obtido foi revelado por eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR Safe (Invitrogen®).

2.4. RESULTADOS

Foram empregados 180 ortólogos de *A. thaliana* e 197 de *S. polyrhiza*, os quais resultaram em 226 e 268 ortólogos em *L. minor*, respectivamente. Dos *queries* utilizados para busca, 27 alvos não apresentaram correspondência no banco de *L. minor*. Ainda, 38 ortólogos foram excluídos das análises por não estarem associados aos 42 cromossomos de *L. minor*, estando, portanto, em *contigs* que ainda não fazem parte da montagem dos cromossomos.

Foram totalizados 231 ortólogos que representam os genes envolvidos na síntese dos nucleotídeos-açúcares, amido e sacarose. Eles foram categorizados em cinco grupos: metabolismo de sacarose (44), amido (24), hemiceluloses (92), pectinas (50) e celulose (21) (**Tabela 2.1**), os quais foram validados em relação a presença do domínio proteico esperado (**Apêndice 2.3**).

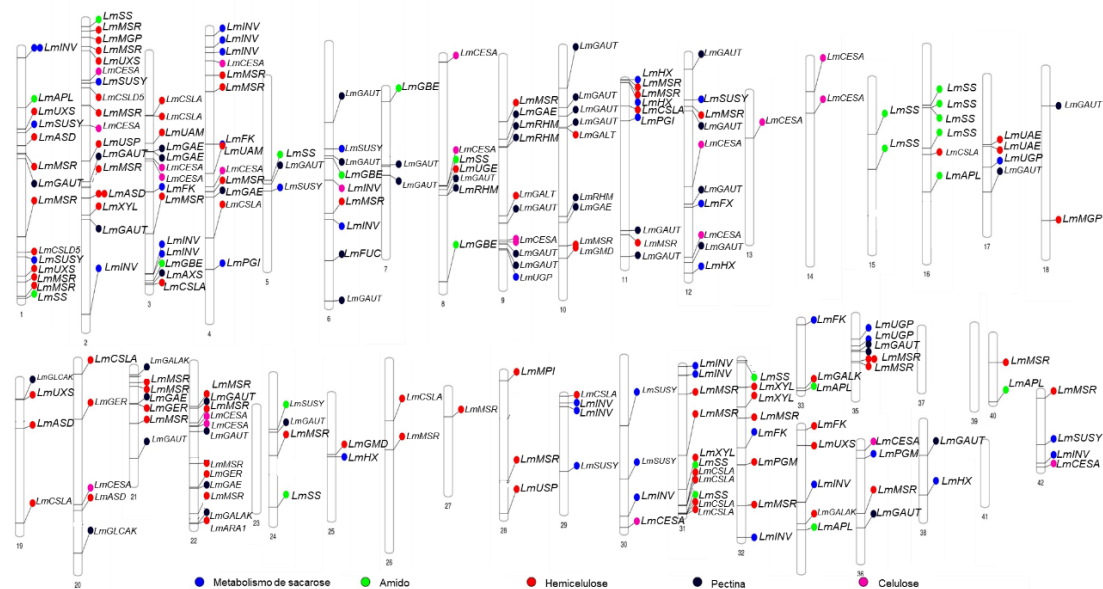


Figura 2.1. Fenograma dos ortólogos de *L. minor* da via dos nucleotídeos açúcares. Os 42 cromossomos de *Lemna minor* 8627 são representados e a distribuição dos genes envolvidos na síntese de amido, sacarose e nucleotídeo-açúcares são representados. Alvos em azul representam ortólogos do metabolismo de sacarose, verde de amido, vermelho de hemiceluloses, preto de pectinas e rosa de celulose.

Possíveis parálogos dos genes alvos foram determinados por similaridades e destes foram selecionadas 70 sequências para análise de transcritos da via dos nucleotídeos-açúcares. Foram desenhados iniciadores específicos para as 70 sequências selecionadas, dos quais 69% apresentaram amplificação específica e serão empregados futuramente para o mapeamento dos nucleotídeos-açúcares em *Lemna minor*.

Tabela 2.1. Distribuição cromossômica de ortólogos de *L. minor* da via dos nucleotídeos açúcares. Cores mais intensas representam maior incidência gênica.

Cromosomo	Número genes	Metabolismo sacarose	Amido	Hemiceluloses	Pectinas	Celulose
1	15	4	2	8	1	0
2	18	2	1	11	2	2
3	14	3	1	5	3	2
4	13	5	0	5	1	2
5	3	1	1	0	1	0
6	9	2	1	1	4	1
7	3	0	1	0	2	0
8	7	0	2	1	2	2
9	10	1	0	2	6	1
10	9	0	0	3	6	0
11	9	3	0	4	2	0
12	10	3	0	1	4	2
13	1	0	0	0	0	1
14	2	0	0	0	0	2
15	2	0	2	0	0	0
16	6	0	5	1	0	0
17	4	1	0	2	1	0
18	2	0	0	1	1	0
19	4	0	0	3	1	0
20	5	0	0	3	1	1
21	7	0	0	4	3	0
22	12	0	0	6	4	2
23	0	0	0	0	0	0
24	4	0	2	1	1	0
25	2	1	0	1	0	0
26	2	0	0	2	0	0
27	1	0	0	1	0	0
28	3	0	0	3	0	0
29	4	3	0	1	0	0
30	4	3	0	0	0	1
31	11	2	2	7	0	0
32	8	2	1	5	0	0
33	3	1	1	1	0	0
34	5	1	1	3	0	0
35	7	2	0	3	2	0
36	4	1	0	1	1	1
37	0	0	0	0	0	0
38	2	1	0	0	1	0
39	0	0	0	0	0	0
40	2	0	1	1	0	0
41	0	0	0	0	0	0
42	4	2	0	1	0	1
Total	231	44	24	92	50	21

2.5. DISCUSSÃO

O tamanho do genoma do gênero *Lemna* é diverso, variando entre 356-604 Mpb (WANG; KERSTETTER; MICHAEL, 2011). Essa grande variação se deve ao conteúdo de DNA interespecífico oriundo da evolução desigual desse gênero (WANG; KERSTETTER; MICHAEL, 2011). Ainda, as divergências das variações gênicas parecem estar relacionadas com respostas ao meio ambiente e aos compostos secundários (WANG; KERSTETTER; MICHAEL, 2011).

Como mencionado anteriormente, o genoma de *Lemna minor* 8627 (763 Mpb) pode apresentar até cinco vezes o tamanho de *Spirodela polyrhiza* 7498 (158 Mpb) (ERNEST, 2016; NA et al., 2018). O genoma de *S. polyrhiza* com

menos de 20.000 genes codificantes de proteínas permitiu a demonstração de que as Alismatales (como as lentilhas d'água) sofreram duas rodadas de duplicações completas do genoma durante sua evolução, há 90 milhões de anos atrás, resultando na eliminação de genes codificadores de proteínas não essenciais, transposons e DNA ribossomal (rDNA) (MICHAEL et al., 2017; WANG; WU; MESSING, 2014). Ainda, foram evidenciadas perdas de genes duplicados. Portanto, um comparativo entre diferentes espécies (como *Lemna*, *Spirodela* e *Wolffia*) seria interessante para avaliar número de genes e suas relações com famílias gênicas (VAN HOECK et al., 2015).

A linhagem alvo de estudo (Lm8627) apresenta 42 cromossomos. Na presente análise, foram recuperadas 231 sequências ortólogas de genes envolvidos na síntese de amido, sacarose e nucleotídeos-açúcares (**Apêndice 2.1**). Essas 231 sequências correspondem a 1,17 vezes o número de sequências de *S. polyrhiza* (197 ortólogos) (**Apêndice 1.1**). Isto indica que os genes dessas vias são razoavelmente conservados entre as espécies com baixo número de redundâncias em *Lemna*. Ainda, 27 alvos de *A. thaliana* e *S. polyrhiza* não apresentaram correspondência com de *L. minor* 8627. É sabido que 66% dos genes de *L. minor* 5500 apresentam ortólogos com *S. polyrhiza*, porém 5% dos genes de *L. minor* 5500 apresentam ortólogos apenas em *Oryza sativa* e *Zea mays*, mas não com *S. polyrhiza* (VAN HOECK et al., 2015). Ainda, 8% dos genes são específicos de lentilhas d'água, uma vez que apresentam similaridade única com pelo menos um gene de *S. polyrhiza*, e não são encontrados em outras plantas (VAN HOECK et al., 2015).

O número de cópias de ortólogos recuperados de alvos específicos em *L. minor* 8627 foi na maioria de três cópias, o que pode indicar um organismo triplóide. Essa designação corresponderia com as hipóteses *a priori* do colaborador Dr. Eric Lam sobre a espécie ser triplóide ou um alotetraplóide (dados ainda não publicados). Embora o tamanho do genoma de *Lemna* ser até cinco vezes maior que de *Spirodela*, o número de genes codificantes de proteínas se mantém próximos a 20.000 (**Tabela 2.2**). O tamanho do genoma de *Lemna* é explicado 95% por repetições das ampliações (VAN HOECK et al., 2015) resultante uma duplicação inteira do genoma durante o processo evolutivo (AN et al., 2018).

Tabela 2.2. Tamanho do genoma e número de genes codificantes de proteínas dos gêneros *Spirodela* e *Lemna*.

Espécie e linhagem	Tamanho do genoma (Mpb)	Número de genes	Referência
<i>S. polyrhiza</i> 7498	158	19.623	Wang et al., 2011
<i>S. polyrhiza</i> 9509	158	18.507	Michael et al., 2017
<i>S. intermedia</i> 7747	160	22.245	Hoang et al., 2020
<i>S. intermedia</i> 8410	160	21.594	Hoang et al., 2020
<i>L. minor</i> 5500	481	22.382	Van Hoeck et al., 2015
<i>L. minor</i> 8627	763	NA	
<i>L. gibba</i> 7742	450	21.830	Ernest, 2016

A organização cromossômica, ou seja, a estrutura 3D em que os genes e cromossomos se agregam, está atrelada à replicação, transcrição e reparo do DNA, ou seja está relacionado à função do genoma (HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2011; OUYANG et al., 2020). É interessante observar que um mapeamento de genes atrelado ao conhecimento de territórios cromossômicos a formarem as conformações em *Rabl*, *Bouquette* e *Rosette* como observado por Monroe et al. (2022), poderia, em lentilhas d'água ajudar a compreender a acessibilidade de genes e potencial mutação. Ainda, esse estruturamento 3D do genoma está relacionado com a frequência de mutações decorrente das posições dos corpos gênicos no genoma (MONROE et al., 2022). No caso dos genes relacionados ao metabolismo de nucleotídeos-açúcares, genes únicos tendem a ser essenciais por estarem relacionados à síntese de um dos maiores drenos de carbono nas plantas, o crescimento por divisão celular e o consequente acúmulo de compostos de carbono (polímeros) das paredes celulares. A distribuição dos genes relacionados ao metabolismo de nucleotídeo-açúcares nos 42 cromossomos de *Lemna minor* 8762 parece não ser randômica, já que há certa agregação de genes e cromossomos em que não se observam genes dessa categoria. Nas subcategorias de genes relacionados às vias metabólicas que levam à formação da parede celular (163 genes) e dos açúcares de transporte (sacarose) e reserva (amido) (68 genes), as primeiras parecem predominar, com a seguinte ordem no número de genes em cada subcategoria: hemiceluloses (92), pectinas (50), metabolismo de sacarose (44) celulose (21) e amido (24) (**Figura 2.2. e Tabela 2.1**). A organização 3D de genomas de lentilhas d'água ainda não é conhecida, mas com essa informação a partir de um genoma com poucos genes poderá ser interessante para a compreensão da distribuição cromossômica e relação com transformações genéticas.

2.6. CONCLUSÃO

L. minor apresenta 1.17 vezes mais ortólogos da via dos nucleotídeo-açúcares quando comparado com *S. polyrhiza*, apesar desse aumento não ser compatível com o tamanho de cinco vezes do genoma e uma duplicação completa dos cromossomos. Isso demonstra a ausência de redundância de genes relacionados a síntese de parede celular. A obtenção de informações sobre a organização 3D dos cromossomos pode ter relevância para compreender os processos de expressão, mutações e assim ajudar em futuras aplicações na biotecnologia.

2.7. REFERÊNCIAS

- AN, D. et al. Genomes and transcriptomes of duckweeds. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, n. JUN, p. 1–11, 2018.
- AVCI, U.; PEÑA, M. J.; O'NEILL, M. A. Changes in the abundance of cell wall apiogalacturonan and xylogalacturonan and conservation of rhamnogalacturonan II structure during the diversification of the Lemnoideae. **Planta**, v. 247, n. 4, p. 953–971, 1 abr. 2018.
- BAR-PELED, M.; O'NEILL, M. A. Plant Nucleotide Sugar Formation, Interconversion, and Salvage by Sugar Recycling*. **Annual Review of Plant Biology**, v. 62, n. 1, p. 127–155, 2 jun. 2011.
- BRUCE, B. D.; MALKIN, R. Biosynthesis of the chloroplast cytochrome b6 f complex: Studies in a photosynthetic mutant of *Lemna*. **Plant Cell**, v. 3, n. 2, p. 203–212, 1991.
- BUCKERIDGE, M. S. The evolution of the Glycomic Codes of extracellular matrices. **BioSystems**, v. 164, p. 112–120, 1 fev. 2017.
- CAFFALL, K. H.; MOHNEN, D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 14, p. 1879–1900, 2009.
- CANTÓ-PASTOR, A. et al. Efficient transformation and artificial miRNA gene silencing in *Lemna minor*. **Plant Biology**, v. 17, n. s1, p. 59–65, 2015.
- CEDERGREEN, N.; MADSEN, T. V. Nitrogen uptake by the floating macrophyte *Lemna minor*. **New Phytologist**, v. 155, n. 2, p. 285–292, 1 ago. 2002.
- EMMS, D. M.; KELLY, S. OrthoFinder: solving fundamental biases in whole genome comparisons dramatically improves orthogroup inference accuracy. **Genome Biology**, v. 16, n. 1, p. 157, 6 ago. 2015.
- ERNEST, E. *Status of the Lemna gibba 7742a and Lemna minor 8627 genomes*. *ISDRA*, v.4, n.1, p. 209-211, 2016.
- GIBEAUT, D. M.; CARPITA, N. C. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides. **FASEB Journal**, v. 8, n. 12, p. 904–915, 1994.

HESLOP-HARRISON, J. S. P.; SCHWARZACHER, T. Organisation of the plant genome in chromosomes. **Plant Journal**, v. 66, n. 1, p. 18–33, 2011.

HOANG, P. T. N. et al. Chromosome-scale genome assembly for the duckweed *Spirodela intermedia*, integrating cytogenetic maps, PacBio and Oxford Nanopore libraries. **Scientific Reports** 2020 10:1, v. 10, n. 1, p. 1–14, 5 nov. 2020.

LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. **Nucleic Acids Research**, 22 abr. 2021.

LONGLAND, J. M.; FRY, S. C.; TREWAVAS, A. J. **Developmental Control of Apiogalacturonan Biosynthesis and UDP-Apiose Production in a Duckweed** *Plant Physiol.* [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.plantphysiol.org>. Acesso em: 28 ago. 2020.

MAENG, J.; KHUDAIRI, A. K. Studies on the Flowering Mechanism in *Lemna l.* Amino Acid Changes During Flower Induction. **Physiologia Plantarum**, v. 28, n. 2, p. 264–270, 1 abr. 1973.

MICHAEL, T. P. et al. Comprehensive definition of genome features in *Spirodela polyrhiza* by high-depth physical mapping and short-read DNA sequencing strategies. **Plant Journal**, v. 89, n. 3, p. 617–635, 2017.

MONROE, J. G. et al. Mutation bias reflects natural selection in *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, v. 602, n. 7895, p. 101–105, 2022.

MOON, H.; STOMP, A. Effects of medium components and light on callus induction, growth, and frond regeneration in *Lemna gibba* (duckweed). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, n. January, p. 20–25, 1997.

OECD. **Test No. 221: Lemna sp. Growth Inhibition Test.** [s.l.] OECD, 2006.

OUYANG, W. et al. Decoding the plant genome: From epigenome to 3D organization. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 47, n. 8, p. 425–435, 2020.

PAGLIUSO, D. et al. Correlation of apiose levels and growth rates in duckweeds. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, n. JUL, p. 1–10, 2018.

SOMERVILLE, C. Cellulose Synthesis in Higher Plants. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 22, p. 53–78, 2006.

TRIFINOPOULOS, J. et al. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. **Nucleic acids research**, v. 44, n. W1, p. W232–W235, 8 jul. 2016.

VAN HOECK, A. et al. The first draft genome of the aquatic model plant *Lemna minor* opens the route for future stress physiology research and biotechnological applications. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 188, 25 nov. 2015.

VERBANČIČ, J. et al. Carbon supply and the regulation of cell wall synthesis. **Molecular Plant**, v. 11, n. January, p. 75–94, 2017.

VU, G. T. H. et al. Future Prospects of Duckweed Research and Applications. In: [s.l.] Springer, Cham, 2020. p. 179–185.

WANG, W.; KERSTETTER, R. A.; MICHAEL, T. P. Evolution of Genome Size in Duckweeds (Lemnaceae). **Journal of Botany**, v. 2011, p. 1–9, 2011.

WANG, W.; WU, Y.; MESSING, J. RNA-Seq transcriptome analysis of Spirodela dormancy without reproduction. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 60, jan. 2014.

WOLFE, D. et al. Visualizing genomic information across chromosomes with PhenoGram. **BioData Mining**, v. 6, n. 1, p. 18, 16 dez. 2013.

YAMAMOTO, Y. T. et al. Genetic Transformation of Duckweed Lemna gibba and Lemna minor Published by: Society for In Vitro Biology Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/4293473> . Your use of the JSTOR archive indicates your acceptance of JSTOR ' s Terms and Conditions of Use. **In Vitro**, v. 37, n. 3, p. 349–353, 2001.

CÁPITULO III

CULTURA DE TECIDOS DE *S. polyrhiza* e *L. minor*

Colaboradores: Dra. Eny Floh e MsC Amanda Macedo

3.1. INTRODUÇÃO

As lentilhas d'água são plantas que pertencem a família Lemnaceae e suas características de crescimento acelerado, ciclo de vida curto, população com genética homogênea, fácil cultivo e manejo fazem destas um sistema ideal para a expressão de proteínas com propriedades industriais (CHHABRA et al., 2011; COX et al., 2006; NGUYEN et al., 2012; WANG, 2016).

A aplicação comercial dessas plantas requer um método de indução de calos, regeneração de plantas e tecnologia de transformação genética bem estabelecida (WANG, 2016). A indução de calos e regeneração de plantas consiste no sistema de cultura de tecidos, o qual é uma ferramenta de alto potencial para melhoramento e conservação de germoplasma de plantas. A cultura de tecidos refere-se à cultura de células, tecidos, e/ou órgãos em um meio artificial, em condições axênicas sob condições controladas. O controle da morfogênese por diferentes concentrações e combinação de reguladores de crescimento promove a diferenciação celular e o desenvolvimento do vegetal em um sistema *in vitro*, que potencializa o estabelecimento de manipulações genéticas (LOYOLA; OCHOA, 2018).

Um calo é constituído de inúmeras células vegetais desdiferenciadas com totipotência, que podem ser submetidas a diferentes tipos de pressões seletivas no intuito de isolar células resistentes às condições impostas (LOYOLA; OCHOA, 2018). Devido às características selecionadas, é possível regenerar plantas completas com características específicas. O sistema de cultura de tecidos já foi estabelecido para diversas espécies de lentilhas d'água (*L. gibba*, *L. minor*, *L. perpusilla*, *S. oligorhiza*, *W. arrhiza* e *S. polyrhiza*) (CHHABRA et al., 2011; COX et al., 2006; KHVATKOV et al., 2015a, 2015b; LI et al., 2004; MOON; STOMP, 1997; NGUYEN et al., 2012; RIVAL et al., 2008; VUNSH et al., 2007) e foram avaliadas e otimizadas condições de cultivo, como níveis de sacarose, fitohormônios e condições de luz (MOON; STOMP, 1997). Neste trabalho, se fez necessária a otimização de protocolo de cultivo *in vitro* para *Spirodela polyrhiza* e *Lemna minor*, a fim produzir plantas com transformações genéticas para o gene responsável por sintetizar a apiose das pectinas (*SpAXS*).

3.2. OBJETIVOS

Determinação de protocolo para indução de calos e regeneração de plantas em *S. polyrhiza* 9509 e *L. minor* 8627.

3.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1. Material vegetal

As espécies alvo de estudo foram *S. polyrhiza* 9509 e *Lemna minor* 8627 que foram cedidas pelo Prof. Dr. Eric Lam (*Department of Plant Biology da Rutgers University, NJ, USA*) através da Rutgers Duckweed Stock Cooperative (RDSC). A escolha das espécies foi relacionada com a disponibilidade de genoma (*S. polyrhiza*) e na capacidade de transformação (*L. minor*) das linhagens mencionadas.

As plantas foram cultivadas de forma axênica em erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL do meio Schenck-Hildebrandt (Sigma-Aldrich®) incompleto (SH/2) suplementado com 0,5% sacarose á 25 °C, em fotoperíodo 16 h luz e 8 h escuro com intensidade luminosa de 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

3.3.2. Indução de calos de *S. polyrhiza*

A principal linhagem estudada (*S. polyrhiza* 9509) foi submetida a tratamentos com diversos fitohormônios e químicos seguindo os protocolos de Li et al. (2004), Moon e Stomp (1997), Wang (2016) e Yamamoto et al.(2001). Além desses, novos testes foram conduzidos com variação no meio de cultura, concentração na fonte de carbono, fotoperíodo, explantes e fitohormônios. Os meios testados foram Murashige e Skoog (MS), McCown Woody Plant (WPM) e Schenck-Hildebrandt (SH) e a fonte de carbono testada foi 3% sacarose e 0,5% sacarose. Além disso, o teste de indução foi realizado em 2 fotoperíodos: escuro e dia longo. Os explantes avaliados foram raízes, frondes completas, região meristemática da fronde e meia fronde. Os fitohormônios foram suplementados ao meio de cultura com diferentes combinações e concentrações de ácido naftaleno acético (ANA), thiazuron (TDZ), ácido 2,4-diclorofenoacético (2,4-D), ácido 3-indol acético (AIA), benziladenina (BA) e cinetina (KIN) (**Tabela 3.1**).

Tabela 3.1. Combinações de fitohormônios testados na indução de calos de *Spirodela polyrhiza* 9509. As concentrações de ácido naftaleno acético (ANA), thiazuron (TDZ), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 3-indol acético (AIA), benziladenina (BA) e cinetina (KIN) estão expressas em mg.L⁻¹.

Tratamento	AIA	KIN	BA	ANA	TDZ	2,4-D
1	-	-	-	-	-	-
2	10	2	2	-	-	-
3	5	2	2	-	-	-
4	2	2	2	-	-	-
5	2	2	-	-	-	-
6	2	-	2	-	-	-
7	-	2	2	-	-	-
8	2	-	-	-	-	-
9	-	2	-	-	-	-
10	-	-	2	-	-	-
11	-	-	-	10	2	1
12	-	-	-	5	2	1
13	-	-	-	2	2	2
14	-	2	-	2	-	-
15	-	2	-	5	-	-
16	-	2	-	10	-	-
17	-	-	-	1,5	-	-
18	-	-	-	-	1,5	-
19	-	-	-	-	-	1,5
20	-	1,5	-	-	-	-
21	-	2	-	2	-	2

3.3.3. Indução, propagação e regeneração de calos de *L. minor*

Além de *S. polyrhiza*, *L. minor* também foi submetida à cultura de tecidos como estabelecido por Cantó-Pastor et al. (2016), no qual a indução de calos foi realizada com 4,4 g.L⁻¹ meio de Murashige e Skoog (MS); 30 g.L⁻¹ sacarose; 5 µM 2,4-D; 0,5 µM TDZ; 5 g.L⁻¹ ágar (pH 5,6). Os calos foram mantidos e propagados em meio contendo 4,4 g.L⁻¹ de mistura de sais de MS; 30 g.L⁻¹ sacarose; 1 µM 2,4-D; 2 µM 6-benzilaminopurina (BAP); 5 g.L⁻¹ ágar (pH 5,6).

A regeneração dos calos em novas plantas, se deu em meio contendo 3,2 g.L⁻¹ de mistura de sais de SH; 10 g.L⁻¹ sacarose; 500 mg.L⁻¹ cefotaxime e 5 g.L⁻¹ ágar (pH 5,6) (CANTÓ-PASTOR et al., 2016).

3.4. RESULTADOS

Protocolos e testes de indução foram conduzidos para obter a desdiferenciação celular de *S. polyrhiza* em calos. Porém, apenas o teste com meio MS suplementado com 3% sacarose e 1,5 mg.L⁻¹ TDZ, mantido em fotoperíodo de 16 h de luz e 8 h de escuro, apresentou resposta para *S. polyrhiza* 9509 (**Figura 2.1**).

Após aproximadamente dois meses, as plantas iniciaram o processo de desdiferenciação celular (**Figura 3.1B**) e a formação do calo foi obtida após 10 meses (**Figura 3.1C**). Porém, a proliferação dos calos obtidos ocorre com uma baixa taxa de crescimento em que a viabilidade das células é quase nula. Sendo assim, o processo de cultura de tecidos para a transgenia foi abortado e apenas transformações de frondes como explantes foram conduzidas para esta espécie.

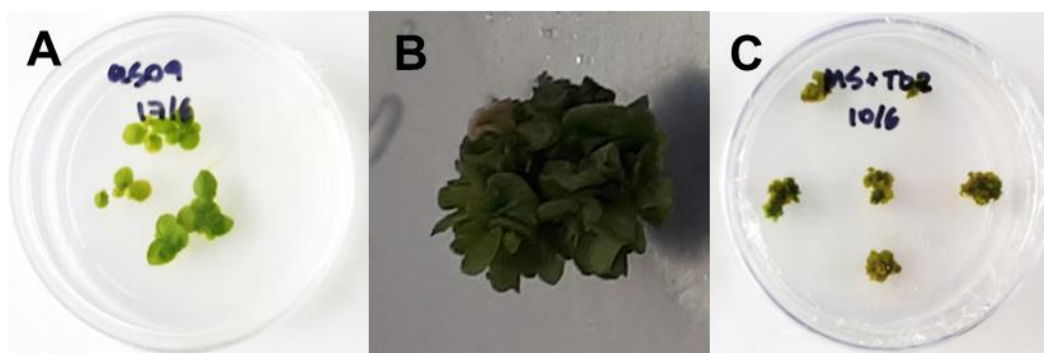


Figura 3.1. Processo de formação de calos de *Spirodela polyrhiza*. **A.** Imagem representativa de *S. polyrhiza*. **B.** Processo de indução de calos após 2 meses de incubação. **C.** Calos formados de *S. polyrhiza* após 1 ano.

Como alternativa foi utilizada *L. minor* 8627 (**Figura 3.2A**) que possui um protocolo mais bem estabelecido de cultura de tecidos, determinado por Cantó-Pastor et al. (2016), a qual também é passível de transformação e apresenta um *draft* de seu genoma.

Calos foram obtidos após três meses de indução em meio MS suplementado com 3% sacarose, 5 µM de 2,4-D, 0,5 µM de TDZ e 0,5 uM ágar (pH 5,6) (**Figura 3.2B**). Os calos obtidos foram mantidos em meio MS suplementado com 3% sacarose, 1 µM 2,4-D, 2 µM BAP e 5 g.L⁻¹ ágar (pH 5,6). O processo de regeneração de calos de *L. minor* foi possível com calos friáveis de tamanho >40 mm de diâmetro.

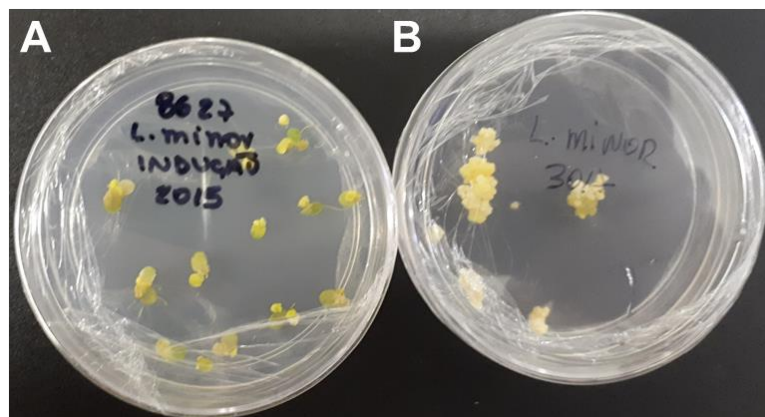


Figura 3.2. Processo de formação de calos de *Lemna minor*. A. Frondes de *L. minor*. **B.** Calos de *L. minor* após 3 meses de indução.

3.5. DISCUSSÃO

Desde 1990, *Spirodela* e *Lemna* têm sido testadas para engenharia genética e para métodos de transformações estáveis precisam ser desenvolvidos protocolos de cultura de tecidos (STOMP, 2005). Tecidos vegetais respondem de forma distinta a cultura de tecidos. Em alguns casos, o tecido pode apresentar recalcitrância, isto é inabilidade das células, tecidos e órgãos de responder a cultura de tecidos (BENSON, 2000). *S. polyrhiza* 9509 se mostrou recalcitrante a cultura de tecidos, uma vez que a indução de calos foi ineficaz para 21 combinações de fitohormônios e protocolos já estabelecidos (LI et al., 2004; MOON; STOMP, 1997; WANG, 2016). Geralmente, os fatores de maior peso para a causa dessa recalcitrância se deve à fisiologia da planta, manipulação *in vitro* e estresse *in vitro* (BENSON, 2000). Neste caso, hipoteticamente a fisiologia do ecótipo 9509 de *S. polyrhiza* apresenta uma resposta bloqueada. Para tanto foram testados diferentes explantes, meios de cultura, fotoperíodos diferentes, bem como concentrações de sacarose distintas. A escolha da fonte de carbono, sacarose, se deve ao fato de que este é o açúcar mais abundante translocado pelo floema em plantas, sendo facilmente catabolizado, tornando este uma ótima fonte para culturas *in vitro* (STRICKLAND et al., 1987). Porém, nenhuma modificação teve êxito na indução de calos.

Os reguladores de crescimento 2,4-D, BA e TDZ são amplamente empregados na indução de calos de monocotiledôneas (KHAVATKOV et al., 2015a) e para *S. polyrhiza* 9509 a única desdiferenciação celular foi obtida com o uso de TDZ. TDZ é uma citocinina-*like* que atua na abscisão foliar, aumenta a

produção endógena de etileno, conversão de ribonucleotídeos citocínicos em ribonucleotídeos biologicamente ativos, síntese de purina endógena ou inibição de sua degradação, aumenta a proliferação de brotos laterais e induz a formação de calos e brotos na organogênese (HUETTEMAN; PREECE, 1993; LU, 1993). Ainda, a seleção de frondes-mãe como explante minimizou a propagação clonal, além de permitir a maior exposição da região meristemática aos reguladores de crescimento e potenciais indutores de calos (LI et al., 2004).

Devido à recalcitrância de *S. polyrhiza* apresentada, a espécie *L. minor* 8627 foi submetida a cultura de tecidos como uma alternativa, visto que havia protocolos bem estabelecidos tanto indução de calos, regeneração de plantas, quanto para transformação genética. Seguindo o descrito por Cantó-Pastor *et al.*, (2016) foi possível obter calos e regenerar plantas. A indução de calos de lentilhas d'água tem sido reportada com eficiência de 10 e 89% para *L. gibba* e *L. minor*, respectivamente (HUANG et al., 2016; MOON; STOMP, 1997; STEFANIAK; WOŻNY; BUDNA, 2002). No presente estudo a taxa de eficiência da indução encontrada foi de 20% e a taxa de regeneração quando na presença de cefotaxime foi de 70%. O uso deste antibiótico otimiza o processo de regeneração (DANILOVA; DOLGIKH, 2004), como cefotaxime também foi empregado para eliminação de *Agrobacterium tumefaciens* (**Capítulo IV**) seu uso condiz com os protocolos que serão executados para transformação genética. Sendo assim, as transformações estáveis foram conduzidas com calos de *L. minor* 8627.

3.6. CONCLUSÃO

A linhagem de estudo *S. polyrhiza* ecótipo 9509 originário da Alemanha não respondeu de forma eficaz aos tratamentos para a indução de calos. Portanto, a mesma não pode ser empregada para transformações que necessitem deste sistema. Por outro lado, *L. minor* 8627 respondeu de forma eficaz ao descrito na literatura podendo ser usada como modelo para o sistema de transformação.

3.7. REFERÊNCIAS

BENSON, E. E. In vitro Plant Recalcitrance : An Introduction Author (s): Erica E

. Benson Source : In Vitro Cellular & Developmental Biology . Plant , Vol . 36 , No . 3 (May - Jun . , 2000) , pp . Published by : Society for In Vitro Biology Stable URL : [http://www.js. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant](http://www.js.invitrocellularanddevelopmentalbiology-plant.com), v. 36, n. 3, p. 141–148, 2000.

CANTÓ-PASTOR, A. et al. Efficient transformation and artificial miRNA gene silencing in *Lemna minor*. **Plant Biology**, v. 17, n. 1, p. 59–65, 2016.

CHHABRA, G. et al. Genetic transformation of Indian isolate of *Lemna minor* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and recovery of transgenic plants. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 17, n. 2, p. 129–136, abr. 2011.

COX, K. M. et al. Glycan optimization of a human monoclonal antibody in the aquatic plant *Lemna minor*. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1591–1597, 2006.

DANILOVA, S. A.; DOLGIKH, Y. I. The stimulatory effect of the antibiotic cefotaxime on plant regeneration in maize tissue culture. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 51, n. 4, p. 559–562, jul. 2004.

HUANG, M. et al. Rapid and highly efficient callus induction and plant regeneration in the starch-rich duckweed strains of *Landoltia punctata*. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 5, 2016.

HUETTEMAN, C. A.; PREECE, J. E. Article in Plant Cell Tissue and Organ Culture · May. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 33, p. 105–119, 1993.

KHVATKOV, P. et al. Callus induction and regeneration in *Wolffia arrhiza* (L.) Horkel ex Wimm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 120, n. 1, p. 263–273, 2015a.

KHVATKOV, P. et al. Transformation of *Wolffia arrhiza* (L.) Horkel ex Wimm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 123, n. 2, p. 299–307, 2015b.

LI, J. et al. Callus induction and regeneration in *Spirodela* and *Lemna*. **Plant Cell Reports**, v. 22, n. 7, p. 457–464, 2004.

LOYOLA, V. M.; OCHOA, N. **Culture Protocols**. 2018.

LU, C.-Y. **THE USE OF THIDIAZURON IN TISSUE CULTURE 1In Vitro Cell. Dev. Biol.** [s.l: s.n.].

MOON, H.; STOMP, A. Effects of medium components and light on callus induction, growth, and frond regeneration in *Lemna gibba* (duckweed). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, n. January, p. 20–25, 1997.

NGUYEN, L. V et al. Genetic engineering of a *Lemna* isoleucine auxotroph. **Transgenic Res**, v. 21, p. 1071–1083, 2012.

RIVAL, S. et al. *Spirodela* (duckweed) as an alternative production system for pharmaceuticals: A case study, aprotinin. **Transgenic Research**, v. 17, n. 4, p. 503–513, 2008.

STEFANIAK, B.; WOŹNY, A.; BUDNA, I. **Callus induction and plant regeneration in *Lemna minor* L.** **Biologia Plantarum**, 2002.

STOMP, A.-M. M. The duckweeds: a valuable plant for biomanufacturing. **Biotechnology annual review**, v. 11, n. SUPPL., p. 69–99, 28 jan. 2005.

STRICKLAND, S. G. et al. Effect of carbohydrate source on alfalfa somatic embryogenesis. **Plant Science**, v. 48, n. 2, p. 113–121, 1 jan. 1987.

VUNSH, R. et al. High expression of transgene protein in Spirodela. **Plant Cell Reports**, v. 26, n. 9, p. 1511–1519, 2007.

WANG, Y. Callus Induction and Frond Regeneration in Spirodela polyrhiza. **Czech Journal of Genetics and Plant Breeding**, v. 52, n. 3, p. 114–119, 2016.

YAMAMOTO, Y. T. et al. Genetic Transformation of Duckweed Lemna gibba and Lemna minor Published by: Society for In Vitro Biology Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/4293473> . Your use of the JSTOR archive indicates your acceptance of JSTOR ' s Terms and Conditions of Use. **In Vitro**, v. 37, n. 3, p. 349–353, 2001.

CÁPITULO IV

TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE LENTILHAS D'ÁGUA E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO GENE AXS

Colaboradores: Profa. Dra. Magdalena Rossi e Profa. Dra. Helaine Carrer

4.1. INTRODUÇÃO

O crescimento acelerado das lentilhas d'água combinado ao tamanho reduzido e à reprodução clonal tornam estas plantas interessantes para estudos fisiológicos e tecnologias ômicas (LAM et al., 2014). Além disso, a absorção rápida de nutrientes, a capacidade de secreção de proteínas diretamente no meio de cultura e, a adaptação à diversos microclimas e distintos pHs fazem dessas plantas ótimas biofábricas (YANG et al., 2021). Sendo assim, as lentilhas d'água podem ser utilizadas para o desenvolvimento de plataformas de agricultura sustentável, permitindo aplicações farmacêuticas, alimentícias, cosmetológicas, nutricionais, bioenergéticas, químicas e fitorremediadoras (ACOSTA et al., 2021).

A respeito das aplicações biotecnológicas das lentilhas d'água, linhagens transgênicas poderiam gerar produtos de alto valor agregado e serem alternativas sustentáveis de produção. Apesar de ainda não existirem produtos transgênicos comercializados produzidos em lentilhas d'água, têm-se relatado com sucesso a expressão de anticorpos monoclonais; interferon 2β (COX et al., 2006); aprotinina (RIVAL et al., 2008); E1 endoglucanase (SUN et al., 2007) e; antígenos contra vírus da diarreia suína (KO et al., 2011), tuberculose (PETERSON et al., 2015) e vírus da influenza aviária H5N1 (BERTRAN et al., 2015; FIRSOV et al., 2018; THU et al., 2015). Existem dois sistemas de transformação em lentilhas d'água, um que utiliza frondes e outro que utiliza calos como explantes (YANG et al., 2020). Neste último, o estabelecimento de um protocolo eficiente e reprodutível de obtenção de calos e regeneração de frondes é imprescindível para o sucesso da transformação (STOMP, 2005).

Há relatos da indução de calos e regeneração de lentilhas d'água desde 1870, porém as respostas ao cultivo de tecidos são genótipo-dependentes, o que exige árduos trabalhos para determinar as condições necessárias (i.e. fitohormônios e meios de cultivo) para a obtenção de eficiências adequadas de transformação e regeneração (YANG et al., 2021). Como descrito no **Capítulo III**, *Spirodela polyrhiza* do ecótipo 9509 originário da Alemanha, não responde de forma eficiente e reprodutível à cultura de tecidos. Por outro lado, apesar do protocolo de transformação de frondes de lentilhas d'água ser mais rápido, há apenas um trabalho reportando transformação estável (YANG et al., 2018).

A reprodução das lentilhas d'água ocorre de forma assexuada, por propagação clonal e isso leva a geração de uma população geneticamente homogênea (NAUMANN; EBERIUS; APPENROTH, 2007), favorecendo a transformação genética. A reprodução clonal das lentilhas d'água ocorre de forma rápida, de tal forma que a biomassa acumulada corresponde a 88-117 t.ha⁻¹.ano⁻¹ (ZIEGLER et al., 2014). Esse crescimento, 30 vezes mais rápido que os cultivares agrícolas (LAM et al., 2014), hipoteticamente está associado à capacidade do açúcar apiose de reter boro na parede celular.

A parede celular é formada por microfibrilas de celulose interligadas à hemiceluloses e lignina, imersos a uma matriz péctica (CARPITA; GIBEAUT, 1993). Como descrito no **Capítulo I**, os polissacarídeos da parede celular são sintetizados a partir do precursor UDP-glicose através da síntese de nucleotídeos-açúcares que funcionam como blocos construtores dos polissacarídeos (BAR-PELED; O'NEILL, 2011). No caso das lentilhas d'água, as paredes primárias são do tipo I, constituídas de uma matriz celulose-hemiceluloses com predominância de xiloglucanos imersos em pectinas (CARPITA; GIBEAUT, 1993), sendo que xilanos e glucomananos também são encontrados (SOWINSKI et al., 2019). Uma característica peculiar das paredes de lentilhas d'água é que elas apresentam alto conteúdo de pectinas (até 33%) (CHANDA; BHADURI; SARDAR, 1991; HART; KINDEL, 1970) junto com a presença abundante de apiose em sua composição (AVCI et al., 2018). O conteúdo de apiose está relacionado com o processo evolutivo das lentilhas d'água, já que as espécies da subfamília Lemnoideae apresentam maiores teores de apiogalacturonanos, enquanto as Wolffioideae apresentam alta proporção de xilogalacturonanos, porém seu conteúdo de apiose ainda é maior que as demais angiospermas (AVCI et al., 2018). A incidência do conteúdo dessas pectinas está hipoteticamente relacionada ao crescimento dessas plantas (PAGLIUSO et al., 2018), pelo fato de que os apiogalacturonanos são capazes de reter íons.

Os apiogalacturonanos são formados de cadeia principal de ácidos galacturônicos α -(1→4) ligados com ramificações O-2 e O-3 de apiofuraose (MOHNEN, 2008). Nas lentilhas d'água, além dos apiogalacturonanos, a apiose é encontrada nos ramnogalacturonanos do tipo II (RG-II). Esses polissacarídeos,

correspondem ao 10% do conteúdo pécico nas plantas (O'NEILL et al., 2004), são essenciais para o desenvolvimento devido à complexação do micronutriente essencial boro à apiose (ISHII; MATSUNAGA; HAYASHI, 2001; MATOH; KAWAGUCHI; KOBAYASHI, 1996). Essa classe de pectinas apresenta a estrutura mais complexas dentre os polissacarídeos da parede por apresentar pelo menos 8 resíduos de α -(1→4)-D-ácido galacturônico com quatro cadeias laterais constituídos de 12 açúcares distintos e mais de 20 ligações glicosídicas (MOHNEN, 2008). Esses polissacarídeos são encontrados nas paredes em forma de dímeros ligados pela ligação 1:2 éster borato diol entre os resíduos de apiose na cadeia A de dois monômeros de RG-II (O'NEILL et al., 2004). Portanto, estudos que elucidem a síntese de apiose e a importância desse açúcar nas lentilhas d'água são fundamentais para a fisiologia dessa planta e para diversas aplicações.

A enzima bifuncional UDP-APIOSE/UDP-XILOSE SINTASE (AXS), responsável pela síntese de apiose e xilose, é codificada pelo gene AXS. Em *A. thaliana* há duas cópias, *AtAXS1* e *AtAXS2*, enquanto que *S. polyrhiza* e *Lemna minor* apresentam uma única cópia (**Capítulos I e II**). O estudo realizado por Ahn et al. (2006) avaliou o efeito da deleção de AXS em *Nicotiana benthamiana*, verificando aumento no conteúdo de amido e alteração nas cadeias laterais de RG-II, mas não nos demais constituintes da parede celular. E ainda, o desenvolvimento do tabaco foi comprometido com redução do crescimento, lise celular e de organelas e, amarelamento das folhas (AHN et al., 2006). Zhao et al. (2020) verificaram que, enquanto duplos mutantes *ataxs1/ataxs2* são letais, mutantes simples perdem a dominância apical da parte aérea e da raiz, são incapazes de gerar sementes e as paredes são mais espessas com menos ligações entre RG-II e boro. Porém, o efeito desse gene em plantas com a presença de apiogalacturonanos, como as lentilhas d'água, é desconhecido. Interessantemente, quando *S. polyrhiza* entram em dormência, as paredes são remodeladas sem apiose e ocorre acúmulo de amido (LONGLAND; FRY; TREWAVAS, 1989). Essa modificação na composição de carboidratos junto com a redução de aerênquima fazem com que as plantas fiquem submersas e sobrevivam em locais de congelamento dos rios e lagos (APPENROTH;

TELLER; HORN, 1996; OLÁH; HEPP; MÉSZÁROS, 2016; PERRY; BYRNE, 1969; SMART; TREWAVAS, 1983; WANG; WU; MESSING, 2014)

Hipoteticamente, a abundância de apiose na parede celular das lentilhas d'água permite que os membros da família Lemnoideae armazenem elevados teores de boro. Essa maior disponibilidade do boro resulta em uma elevada taxa de crescimento decorrente da plasticidade da parede em células recém divididas em aumentar, bem como, o acúmulo de compostos fenólicos é interrompido e oxidação da membrana plasmática é cessada mantendo a integridade e força motriz de captação de íons (AHMAD et al., 2008). O maior crescimento faz com que o metabolismo seja investido em parede que irão constituir as novas células, o que leva à redução do conteúdo de carboidrato de armazenamento (amido) pela via ADP-glucose.

4.2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente capítulo foram (i) determinar um protocolo de transformação genética estável de lentilhas d'água; (ii) obter linhagens transgênicas com superexpressão e silenciamento de *SpAXS* e; (iii) caracterizar funcionalmente as linhagens obtidas em (ii).

4.3. MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1. Material vegetal e processamento

As espécies *S. polyrhiza* 9509 e *Lemna minor* 8627 foram cultivadas por 10 dias de forma axênica em erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio Schenck-Hildebrandt (Sigma-Aldrich®) incompleto (SH/2) suplementado com 0,5% sacarose à 25 °C, em fotoperíodo 16 h luz e 8 h escuro com intensidade de luz fotossinteticamente ativa de 20 $\mu\text{mols.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Em cada coleta as plantas foram recuperadas por filtragem em nylon. Para as análises bioquímicas, as plantas foram acondicionadas em folhas de alumínio, congeladas em nitrogênio líquido, secas em liofilizador (L101- LioTop) e submetidas à pulverização (GenoGrinder - Spex-Sample Prep 2010). Para análises de biologia molecular, imediatamente após a coleta, o material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C.

4.3.2. Análise do gene alvo

A sequência do gene *AXS* de *S. polyrhiza*, *SpAXS*, foi obtida dos bancos de dados do *Phytozome* v12.1.6 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>) e NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) onde se encontram disponíveis os genomas das linhagens 7498 (1355448V2) e 9509 (ASM19814V1), respectivamente. As duas cópias de *AXS* de *A. thaliana*, *AtAXS1* (AT2G27860) e *AtAXS2* (AT1G08200), foram usadas como *query* para a identificação de *SpAXS* por BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) contra os genomas de *S. polyrhiza* 9509 e 7498. A busca foi realizada usando tBlastP (E-value > e^{-10}) na plataforma *Phytozome* (7498) ou usando tBlastN no NCBI (9509). A sequência foi recuperada e anotada para identificação de íntrons e éxons através do software online *Splign* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/splign/splign.cgi>). A sequência de *L. minor* 8627 (201904v2) foi recuperada por meio do software *OrthoFinder* 2.3.1 (EMMS; KELLY, 2015) e BlastP usando a sequência de aminoácidos de *S. polyrhiza* 7498 e de *A. thaliana* como descrito no **Capítulo II**. As sequências codificantes de *S. polyrhiza* e *L. minor* foram alinhadas por *ClustalW* (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) na plataforma *BioEdit* (HALL, 2011).

4.3.3. Desenho do RNA de interferência (RNAi)

Para o silenciamento do gene alvo foi utilizada a técnica de RNA de interferência (RNAi) que se baseia na expressão, nas duas orientações, de um fragmento da região transcrita do gene alvo resultando em um pequeno RNA dupla fita em forma de *hairpin* que leva à degradação do transcrito alvo. Para a escolha do fragmento, foram levados em consideração a especificidade gênica, o tamanho e a região do gene alvo (BAUM et al., 2007; HUVENNE; SMAGGHE, 2010; MAMTA; RAJAM, 2017; RODRIGUES; FIGUEIRA, 2016; YOUNIS et al., 2014; YU et al., 2013). A porção codificante do gene *SpAXS* (CDS) foi analisada por meio do software *SciTool RNAi Design*® (*Integrated DNA Technologies, Inc* - https://www.idtdna.com/site/order/designtool/index/DSRNAI_CUSTOM), a fim de identificar regiões com maior probabilidade de gerar pequenos RNAs. O desenho dos oligonucleotídeos foi realizado com o software *Primer-Blast* (NCBI - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) de acordo com os seguintes parâmetros: $57\text{ °C} \leq T_m$ (iniciador) $\leq 63\text{ °C}$; $30\% \leq CG \leq 80\%$; $18\text{ pb} \leq$ tamanho

do iniciador ≤ 27 pb; 100 pb \leq tamanho amplicon ≤ 350 pb; 0 °C \leq Tm do amplicon ≤ 85 °C. Os oligonucleotídeos desenhados foram analisados em relação à sua estrutura pelo programa *Oligo Analyzer Tool*® (*Integrated DNA Technologies*® - <https://www.idtdna.com/calc/analyzer/>) e selecionados seguindo os parâmetros: 40 °C \leq hairpin; $0 \leq$ pareamento *self-dimer* ≤ 3 e $0 \leq$ pareamento *hetero-dimer* ≤ 4 . O tamanho do *amplicon* confeccionado para a formação de *hairpin* foi de 309 pb (**Apêndice 4.1**).

4.3.4. Desenho de SpAXS para superexpressão

Para que a superexpressão do gene *SpAXS* foram desenhados iniciadores para amplificar desde o códon iniciador até o terminador de 1182 pb.

4.3.5. Extração de RNA, síntese de cDNA e amplificação de genes selecionados

Para a amplificação dos fragmentos de silenciamento e superexpressão, assim como para as posteriores análises de expressão gênica foi necessário a obtenção de cDNA. Para isso o mRNA foi extraído a partir de 20 mg de material fresco com o kit *ReliaPrep RNA Tissue Mini-prep System* (Promega®), seguindo as especificações do fabricante. As amostras foram quantificadas por espectrometria (Nanodrop ND-1000 UV-VIS Thermo Scientific®) e o controle de integridade analisado em gel de agarose 1% corado com SYBR Safe (Life Technologies). Amostras com razão 260/280 entre 1,8-2,0 foram consideradas suficientemente puras e posteriormente utilizadas. Para eliminação do DNA contaminante, 1 μ g de mRNA foi tratado com *DNase I* (Promega®) seguindo as especificações do fabricante e posteriormente submetido a transcrição reversa com 50 ng de oligonucleotídeos randômicos; 1mM dNTP; 2,5 mM MgCl₂, 10 mM dTT, 40 U *RNAseOUT*, 200 U *SuperScript III Reverse Transcriptase* e 30 U *RNAseH*, seguindo as especificações do fabricante (Life Technologies®). Para confirmar se a reação da transcrição reversa funcionou, o cDNA foi submetido a PCR com oligonucleotídeos constitutivos (*SpPP2A* e *Lm18S* – **Apêndice 4.2**) em reações de 1U *GoTaq DNA Polimerase* (Promega®), 0,2 mM dNTPs, 0,2 uM iniciador e tampão 1X em 20 μ L de reação. As reações de PCR seguiram o programa de ciclagem de 2 minutos de incubação a 95 °C, seguido de 30 ciclos

de incubação a 95 °C por 30 s, anelamento dos iniciadores a 60 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 45 s, e extensão final a 72 °C por 5 min. O produto obtido foi revelado por eletroforese a 115V em gel de 1% agarose corado com SYBR Safe (Invitrogen®).

4.3.6. Obtenção das construções de silenciamento e superexpressão

Para a obtenção dos vetores de transformação, tanto silenciamento quanto superexpressão foi utilizado o sistema *Gateway* de clonagem (HARTLEY; TEMPLE; BRASCH, 2000).

Os produtos de PCR obtidos do gene *SpAXS* para silenciamento e do CDS do gene *SpAXS* (**Apêndice 4.1**) foram purificados pelo *Kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up* (Macherey-Nagel GMBH & Co), seguindo as especificações do fabricante. O material recuperado foi sequenciado pelo ABI 3730 DNA *Sequence Analyzer* (Applied Biosystems®) com BigDye® *Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit* e analisadas pelo *software Bioedit®*. O sequenciamento foi realizado no Laboratório de Gênômica e Elementos de transposição (GaTE Lab) coordenado pela Profa. Dra. Marie-Anne van Sluys do Departamento de Botânica IB-USP.

O produto de PCR purificado foi inserido no vetor pCR8/GW/TOPO TA *cloning* (Thermo Scientific®) (**Figura 4.1**) com uma proporção de 1:5 de vetor-inserto seguindo as instruções do fabricante. Em seguida a reação de ligação foi transformada em *One shot™* Top10 *Escherichia coli* (Thermo®) DH10β quimiocompetente por choque térmico. A reação de transformação foi plaqueada em meio de cultura Luria-Bertani (LB) (5 g.L⁻¹ extrato de levedura, 10 g.L⁻¹ NaCl, 10 g.L⁻¹ triptona e 15 g.L⁻¹ ágar) suplementado com 100 µg.mL⁻¹ de espectinomicina e incubada à 37 °C *overnight*.

Para verificar se as colônias obtidas incorporaram o vetor-inserto foi realizada uma PCR de colônia. Meia colônia foi incorporada em 10 µL de água miliQ autoclavada e lisada à 95 °C por 5 min e em seguida foi realizada a amplificação por PCR direcional com os iniciadores senso específico (*SpAXS*) e antissenso M13, como descrito anteriormente (**Apêndice 4.2**). O restante da colônia foi inoculada meio LB líquido suplementado com 100 µg.mL⁻¹ de

espectinomicina para estocagem e purificação do plasmídeo. O plasmídeo foi extraído por meio do *kit Wizard Plus SV Mini-prep DNA Purification System A1330* (Promega®). A quantificação e pureza dos plasmídeos obtidos foram verificadas empregando o espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 UV-VIS *Spectrophotometer* (Thermo Scientific®). Os plasmídeos positivos foram sequenciados, como descrito acima.

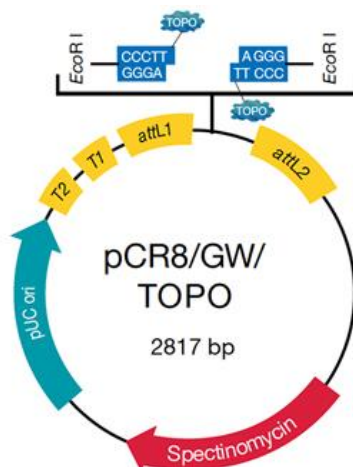


Figura 4.1. Vetor de entrada pCR®8/GW/TOPO® para a construção dos cassetes do gene AXS de *Spirodela polyrhiza*. Representação do mapa do vetor pCR8/GW/TOPO da Thermo® que apresenta sítio de origem de replicação pUC, sítios de recombinação *attL1* e *attL2*, região para ligação produto de PCR por sistema TA e gene de seleção por espectinomicina.

Fonte: Thermo®. Disponível em: <https://www.thermo.com/br/en/home/life-science/cloning/gateway-cloning/entry-clones.html>. Acesso em 29/06/2019.

Para a subsequente subclonagem no vetor de destino foram amplificados os fragmentos de interesse com o par de iniciadores *M13*. A **Figura 4.2** representa o mapa dos sítios recombinação e de anelamento dos oligonucleotídeos *M13* no vetor pCR™8/GW/TOPO® TA Cloning®. O produto de PCR obtido do tamanho esperado foi recuperado do gel de agarose 1% e purificado pelo kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up (Macherey-Nagel GmbH & Co). Os fragmentos foram recombinados nos vetores destino PK7GWIWG2 (I), para silenciamento, e pFAST-R02, para superexpressão, (**Figura 4.3**) na proporção 1:5 utilizando LR clonase II (Thermo-®) de acordo com as instruções do fabricante.

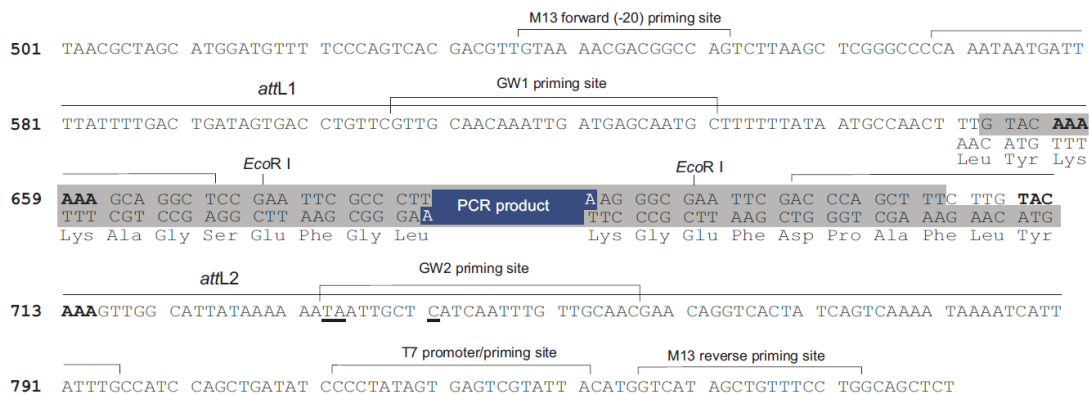


Figura 4.2. Mapa com sítios de recombinação e dos oligonucleotídeos M13 no vetor pCR™8/GW/TOPO® TA Cloning®.

Fonte. Thermo Scientific. pCR™8/GW/TOPO® TA Cloning® Kit Manual, 2012. Disponível em: https://assets.thermo.com/TFS-Assets/LSG/manuals/pcr8gwtopo_man.pdf. Acesso em 29/06/2019.

As reações de recombinação foram utilizadas para transformar *E. coli* quimiocompetente e colônias obtidas foram cultivadas e analisadas por PCR e sequenciadas.

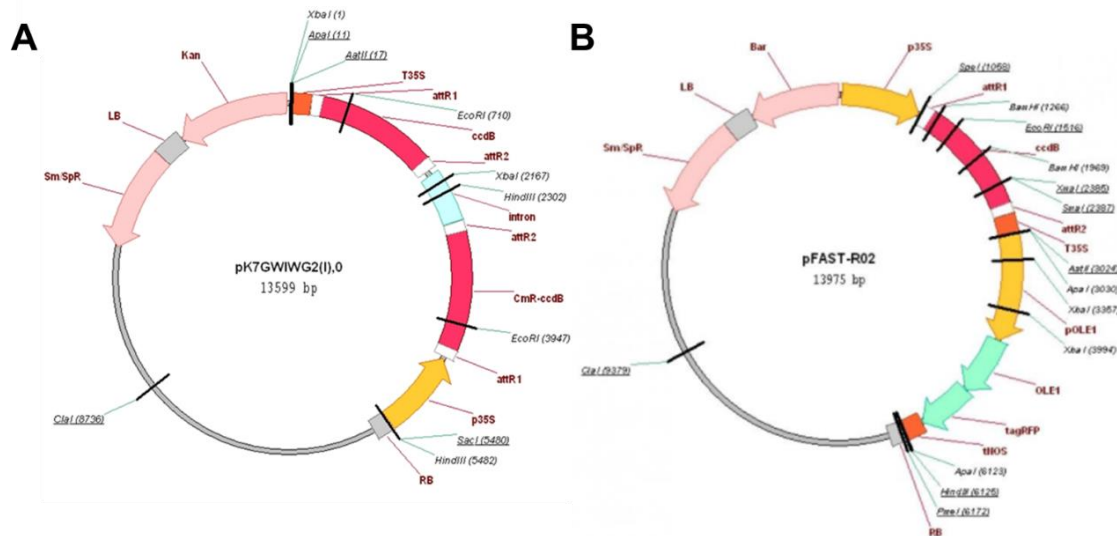


Figura 4.3. Vetores empregados para silenciamento (A) e superexpressão (B) de SpAXS. **A.** Mapa do vetor pK7GWIWG2 (I) o qual apresenta promotor 35S, dois sítios de recombinação attR1 e attR2 intercalados com um íntron, terminador 35S e gene para seleção em planta canamicina e em sistema bacteriano espectinomicina/estreptomicina. **B.** Mapa do vetor pFAST-R02 o qual apresenta promotor 35S, um sítio de recombinação attR1 e, terminador 35S, marcador para fluorescência vermelha (RFP) sob promotor pOLE1 e terminador Nos e gene para seleção em planta o herbicida Basta® e em sistema bacteriano espectinomicina/estreptomicina. Os vetores foram obtidos pelo VIB-Ugent Center for Plant Systems Biology (Bélgica).

Fonte: VIB-Ugent Center for Plant Systems Biology (<https://gatewayvectors.vib.be/>). Acesso em 23 de maio de 2022.

4.3.7. Transformação em *Agrobacterium tumefaciens*

A transformação de *S. polyrhiza* e *L. minor* foi realizada por meio de *A. tumefaciens*. O plasmídeo de destino clonado com o inserto, assim como o vetor vazio, foi isolado e purificado para a transformação em *A. tumefaciens* EHA 101. A transformação foi realizada com a adição de 1 µg de DNA plasmidial em 50 µL de *A. tumefaciens* EHA 101 quimiocompetente. A reação foi incubada em gelo por 30 min, seguido de congelamento das células em nitrogênio líquido e incubação por 5 min à 37 °C. Após o choque térmico, foi adicionado 1 mL de meio de cultura YEP (10 g.L⁻¹ peptona, 10 g.L⁻¹ extrato de malte e 5 g.L⁻¹ NaCl) e incubado por 2 h à 28 °C, sob agitação de 200 rpm para recuperação das células. As bactérias foram plaqueadas em meio YEP sólido suplementado para seleção e a placa foi incubada à 28 °C por 48 h. Colônias foram selecionadas e checadas por PCR de colônia empregando oligonucleotídeos do promotor do vetor e do gene alvo específico. Os produtos de amplificação foram verificados por eletroforese em gel de agarose a 115 V 1% corado com SYBR Safe® (Invitrogen®).

4.3.8. Teste de toxicidade para seleção de transformantes

Para determinar a concentração adequada de canamicina a ser utilizada para selecionar as plantas transformadas foi realizado um teste de toxicidade. Frondes de *S. polyrhiza* 9509, explante a ser utilizado para a transformação, foi cultivado com diferentes concentrações de canamicina (0, 5, 7,5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 200 e 400 mg.L⁻¹) em meio SH/2 sólido suplementado com 100 mg.L⁻¹ de cefotaxime e 5 g.L⁻¹ sacarose. Foram inoculadas 5 frondes em cada placa (n=5 placas) e as plantas foram acompanhados por 15 dias.

Calos de *L. minor* 8627 já tinham sido transformados e selecionados com o herbicida basta e o antibiótico canamicina, portanto foram empregadas a concentração de 10 mg.L⁻¹ de basta e 100 mg.L⁻¹ de canamicina para a seleção das plantas transformadas segundo protocolo descrito por Cantó-Pastor et al. (2015) e Yamamoto et al. (2001).

4.3.9. Transformação em lentilhas d'água

As frondes de *S. polyrhiza* 9509 foram separadas, as raízes removidas e a região meristemática exposta, também leves ranhuras foram realizadas nas superfícies das frondes com bisturi. Os explantes foram inoculados em uma placa contendo meio sólido ½ SH suplementado com 5 g.L⁻¹ sacarose, 100 mM acetoseringona e 0,4 mM ANA. Já para as transformações de *L. minor*, aproximadamente 100 calos mantidos em meio de propagação foram selecionados e transferidos para tubos de 50 mL.

Do estoque de *A. tumefaciens* carreando o construto, foi cultivado uma placa de meio sólido YEP suplementada com os devidos antibióticos e incubada à 28 °C por 48 h. Após esse período, uma colônia isolada foi transferida para 3 mL de meio YEP líquido com os agentes de seleção e incubada a 28 °C por 18 h sob agitação de 200 rpm. Após o cultivo do pré-inóculo, a escala foi aumentada para 50 mL de meio YEP líquido na qual foi incubada por 12 h, nas mesmas condições citadas. A cultura bacteriana foi recuperada, centrifugada e ressuspensa em meio SH/2 suplementado com sacarose 0,5% e a densidade ótica da cultura foi ajustada para 1,0 (O.D.₆₀₀) e suplementada com 30 µL de 100 mM acetoseringona para cada 10 mL de suspensão, homogeneizada e incubada no escuro por 1 h. Dessa suspensão 3 mL foram adicionadas sobre os explantes de *S. polyrhiza*, os quais foram submetidos à infiltração à vácuo por 10 min sob 35 KPa (Bomba Milipore®) e incubados no escuro por 50 min. Os calos de *L. minor* (**Capítulo III**) foram completamente submergidos e mantidos por 5 min em agitação constante de 150 rpm. O excesso da solução bacteriana foi removido das placas e dos tubos de 50 mL com auxílio de ponteiras. As placas foram lacradas com papel filme de PVC e mantidas no escuro por 48 h à 25 °C. Os calos de *L. minor* foram transferidos para placas contendo meio 4.4 g.L⁻¹ de MS, 3% sacarose, 1 µM 2,4-D, 2 µM de 6-benzilaminopurina (BAP), 100 µM de acetoseringona e 5 g.L⁻¹ ágar (pH 5,6). Após 2 dias de co-cultivo os explantes foram transferidos para regeneração e propagação em meio seletivo contendo 3,2 g.L⁻¹ de mistura de sais de SH; 10 g.L⁻¹ sacarose; 200 mg.L⁻¹ carbenicilina; 500 mg.L⁻¹ cefotaxime; 5 g.L⁻¹ ágar, e 100 mg.L⁻¹ de canamicina (silenciamento) ou 10 mg.L⁻¹ de basta (superexpressão) (pH 5,6). Os calos foram regenerados nessas condições com adição de 2 µM de 6-benzilaminopurina (BAP).

4.3.10. Transformação por biobalística

Os calos de *L. minor* 8627 foram também submetidos a transformação por biobalística como tentativa de obtenção de transgênicos silenciados e superexpressos de *SpAXS1*. Para tanto, os calos foram transferidos para meio de propagação (4,4 g.L⁻¹ meio MS, 30 g.L⁻¹ sacarose, 1 µM 2,4-D, 2 µM BAP, 5 g.L⁻¹ ágar, pH 5,6) suplementados com agentes osmóticos (73 g.L⁻¹ de sorbitol e 73 g.L⁻¹ de manitol) (VAIN; MCMULLEN; FINER, 1993), com papel filtro estéril de forma a circundar toda a placa e mantidos por 4 horas antes da transformação para que os calos entumeçam e resistam a pressão do tiro.

O material genético carreando a construção de silenciamento (35S::RNAi_*SpAXS1* no vetor pK7GWIWG2) e de superexpressão (35S::*SpAXS1* no vetor pFAST_R02), bem como um controle de β-glucuronidase (GUS) foi adsorvido a partículas de ouro para o bombardeamento. As partículas de ouro de 0,6 µm (BioRad®) foram ressuspensas em n X 2 mg em n x 100 µL de etanol 100% gelado, sendo n o número de tiros de acordo com a amostragem empregada. As partículas de ouro foram homogeneizadas por 1 min, centrifugadas a 4000 rpm por 30 s e lavadas em 1 mL de água miliQ autoclavada. As partículas foram ressuspensas em n X 250 µL de água estéril e aliquotadas em 245 µL para cada 10 tiros. As partículas de ouro preparadas foram incubadas com 25 µg de DNA, 250 µL de cloreto de cálcio 2,5 M e 50 µL de espermidina 0,1 M e agitadas por 1 min após a adição de cada reagente. As reações foram incubadas em gelo por 10 min e centrifugadas nas condições já citadas, tendo o sobrenadante descartado.

As partículas de ouro cobertas com DNA foram lavadas duas vezes com 600 µL de etanol 100% gelado e ressuspensas em 65 µL de etanol 100%, para cada tiro foram usadas 6 µL das partículas tratadas. O bombardeamento foi conduzido em PDS-1000/He *Biolistic Particle Delivery System* (BioRad®) com uma pressão de hélio de 1100 PSI e definições de solenóides de fábrica (BioRad®).

Cada placa de calos foi submetida à dois tiros à 9 cm do microcarreador contendo as partículas. Foram transformadas 7 placas de silenciamento, 7 placas de superexpressão e 3 placas contendo 2-3 folhas de tabaco para o teste com GUS. Após 4 horas, os calos foram transferidos da placa para meio de

regeneração (3,2 g.L⁻¹ de SH, 1 µM BAP, 10 g.L⁻¹ sacarose e 5 g.L⁻¹ de ágar – pH 5,6) suplementado com agentes osmóticos (73 g.L⁻¹ de sorbitol e 73 g.L⁻¹ de manitol) e agentes de seleção (100 g.L⁻¹ canamicina ou 10 g.L⁻¹ basta).

4.3.10.1. Quantificação da atividade da enzima repórter β-GLUCURONIDASE (GUS) em tabaco

O controle da transformação por biobalística foi realizado por meio da identificação da β-GLUCURONIDASE (GUS) produto da expressão do gene *uidA* no vetor pFF19 (TIMMERMANS et al., 1990) em folhas de tabaco de plantas de 4 meses. O teste histoquímico de GUS seguiu o descrito por Jefferson (1987) em que após 4 horas da transformação, foram adicionados solução de X-Gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucurônico, sal de ciclohexilamônio) (100 g de X-Gluc; 2,79 g Na₂HPO₄, 4 mL de EDTA 0,5M (pH 7,0); 192 µL de Triton X-100; 0,12 g de K₃Fe(CN)₆; 40 mL de metanol, 145 mL de água destilada e pH 7,0) até cobrir as folhas por completo e incubados à 37 °C por 16 horas em ausência de luz. Após o tempo decorrido, o X-Gluc foi removido e o material vegetal lavado com etanol 70% para facilitar a visualização do produto azul no tecido pela reação da clivagem do substrato X-Gluc pela enzima GUS. O resultado do ensaio pode ser visto no **Apêndice 4.3**.

4.3.11. Genotipagem e expressão gênica dos transgênicos

O DNA foi extraído segundo o protocolo descrito por Edwards et al. (1991) com adaptações. Foram utilizados 50 mg de material macerado em nitrogênio líquido, aos quais foram adicionados 500 µL de tampão de extração (200 mM Tris, 25 mM EDTA, 250 mM NaCl e 0,5% SDS, pH 8,0). Após homogeneização, o sobrenadante foi recuperado por centrifugação, transferido para novo microtubo e adicionados 400 µL de isopropanol. Após 2 min de incubação a temperatura ambiente, centrifugação, e lavagem com etanol 70%, o DNA foi ressuspenso em 30 µL de água miliQ autoclavada, incubado por 10 min à 37 °C e armazenado a -20 °C.

A presença do T-DNA tanto da construção de silenciamento quanto de superexpressão foi verificada por: (i) amplificação do gene de resistência do vetor e; (ii) amplificação do transgene utilizando iniciadores do promotor do gene

alvo (**Apêndice 4.2**). As condições das PCRs foram as mesmas descritas no item 4.3.5 com temperaturas de anelamento específicas para cada conjunto de iniciadores. O resultado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% a 115 V corado com SYBR Safe® (Invitrogen®).

A expressão relativa do gene *SpAXS* nas frondes regeneradas foi testada por RT-qPCR no sistema *QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR* (Applied Biosystems). As reações de PCR foram realizadas com 1,4 µL de cDNA (1:10) (**vide 4.3.5**), 7 µL 2X SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), iniciadores 800 nM e o seguinte ciclo: 95 °C por 10 m, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 10 s, 60 °C por 30 s e 72 °C por 30 s.

Todas as reações foram realizadas em duplicata técnica e triplicata biológica e à amplificação de um único produto foi confirmada através da curva de *melting*. Os valores de *C_q* (*quantification cycle*), a eficiência da reação de cada par de primers foram determinadas pelo *software LinRegPCR* (RUIJTER et al., 2009) e a expressão relativa foi calculada em comparação da expressão média, normalizada através das amostras do selvagem, e os valores de *C_q offtarget* foram normalizados contra a média geográfica da combinação dos genes de referência (VANDESOMPELE et al., 2002). Os genes de referência empregados foram *proteína relaciona a actina (ARF7)* e *proteína fosfatase 2A (PP2A)* para *S. polyrhiza* e *metil transferase NEP1 de RNA de subunidade pequena (18S)* para *L. minor* (PAGLIUSO et al., 2022; YU et al., 2017).

4.3.12. Análises bioquímicas de carboidratos estruturais e não estruturais dos transgênicos

Os carboidratos não estruturais avaliados consistiram em açúcares solúveis (glicose, frutose, sacarose e rafinose) e amido, enquanto os estruturais em monossacarídeos a partir de hidrolisados de parede celular (fucose, arabinose, galactose, ramnose, glicose, xilose, manose e apiose).

Amostras secas e pulverizadas (~10 mg) foram submetidas a três extrações de 1,5 mL etanol 80% (v/v) à 80 °C sob agitação por 20 min para a obtenção dos açúcares solúveis. Os sobrenadantes foram recuperados e o resíduo insolúvel em álcool (AIR) obtido foi seco a 45 °C até completa evaporação do etanol. Os açúcares solúveis extraídos foram secos em

condensador a vácuo rotativo (Thermo-Scientific Savant SC 250 EXP), ressuspendidos em 1 mL de água e 1 mL de clorofórmio (para remoção de pigmentos lipossolúveis) e centrifugados a 13.000 g por 10 min. A porção aquosa (açúcares) foi recuperada e analisados por cromatografia de troca iônica com detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD) em sistema Dionex (ICS 5.000) empregando a coluna CarboPac PA1 eluída com hidróxido de sódio 150 μ M em uma corrida isocrática de 27 m.

O AIR foi submetido à extração de amido a partir de digestões enzimáticas com 120 U.mL⁻¹ α -amilase (E.C. 3.2.1.1) e 30 U.mL⁻¹ amiloglicosidase (E.C. 3.2.1.3) à 75 °C e 50 °C, respectivamente por 1 h cada (AMARAL et al., 2007). A porção solúvel correspondente ao amido hidrolisado que foi analisado em ensaio colorimétrico pela oxidação das glicoses livres e quantificado a partir de uma curva padrão de glicose a 490 nm. O precipitado após a extração do amido corresponde a parede celular.

Para qualificar os monossacarídeos não celulósicos presentes na parede celular, 2 mg da parede foram hidrolisadas com 1 mL ácido trifluoroacético (TFA) 2 M por 1 h à 100 °C. Os monossacarídeos foram secos em concentrador à vácuo, ressuspendidos em água MiliQ e filtrados a 0,22 μ m (Merk Millipore®). Esses foram então analisados em HPAEC-PAD em coluna CarboPac SA10 (sistema ICS 5.000, Dionex-Thermo®) eluída com água e 0.8% hidróxido de sódio (1 mL.min⁻¹) com detecção pela adição de eluente pós-coluna 200 mM NaOH (0,5 mL.min⁻¹).

4.3.13. Análise estatística

Os dados obtidos foram representados com médias e erro padrão. As análises estatísticas foram conduzidas a partir de teste de normalidade, análise de variância one-way (ANOVA) seguido de teste de Tukey (P<0,05) quando pertinente, ou então por teste T-Student (P<0,05). Todas as análises foram realizadas com o software R versão 3.6.1 (2019).

4.4. RESULTADOS

4.4.1. UDP-APIOSE/UDP-XILOSE SINTASE (AXS)

O gene alvo AXS codifica a enzima bifuncional de síntese dos nucleotídeos-açúcares apiose e xilose. Essa enzima apresenta um domínio epimerase o qual é responsável pela descarboxilação do precursor UDP-D-glucuronato acoplado com a contração do anel piranosil para furanosil a formar UDP-apiose (SAVINO et al., 2019). O domínio epimerase foi identificado através do software HMMER entre os aminoácidos 22-293 e 17-288 e; *bit score* de 201.08 e 195.92 para as proteínas de *S. polyrhiza* e *L. minor*, respectivamente. Adicionalmente foi identificada a subfamília à qual pertence a enzima estudada: *FAD/NAD-binding Rossmann fold* composta por enzimas de dois domínios da classe redox. Um domínio é o catalítico que confere especificidade para o substrato, enquanto o segundo domínio, comum à classe de enzimas redox, é um sítio de Rossmann-fold. O sítio de Rossmann-fold apresenta um dobramento de folhas β que é cercado por 5 α -hélices onde se liga ao cofator NAD+ (<http://pfam.xfam.org/clan/CL0063>). O sítio ativo de *SpAXS* e *LmAXS* está na posição 185, e os sítios de ligação com NAD estão nas regiões 49-80, 185-189, 235-240, 253-260 e 337-342 (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9SGE0>). A sequência da enzima alvo de estudo está apresentada na **Figura 4.4** e a estrutura tridimensional da enzima na **Figura 4.5**.

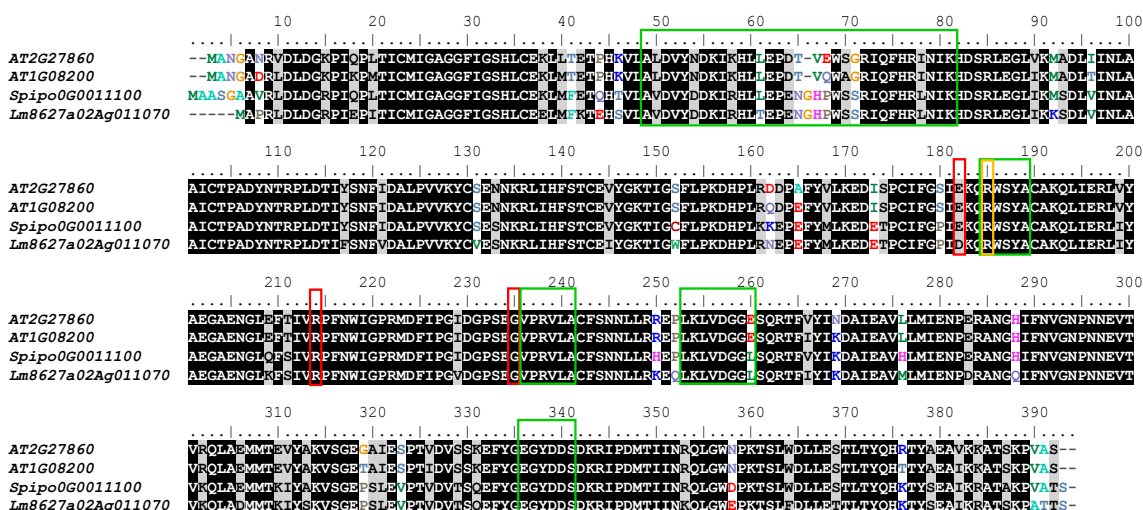


Figura 4.4. Alinhamento da proteína UDP-apiose/UDP-xilose sintase (AXS). As duas primeiras sequências são as proteicas dos dois loci de *Arabidopsis thaliana* (AT). Spipo0G0011100 e Lm8627a02Ag011070 são as sequencias proteicas codificadas pelos loci de *Spirodela polyrhiza* 7498 e de *Lemna minor* 8627, respectivamente. As marcações em verde

representam sítios de ligação de nucleotídeos, os em vermelho sítios de ligação com NAD e em amarelo o sítio ativo da AXS.

As identidades das enzimas de *A. thaliana*, *S. polyrhiza* e *L. minor* foram verificadas e constatou-se que *S. polyrhiza* X *A. thaliana* apresentam identidade de 85%, enquanto *L. minor* X *A. thaliana* apresentam 81%, e *S. polyrhiza* X *L. minor* 91%.

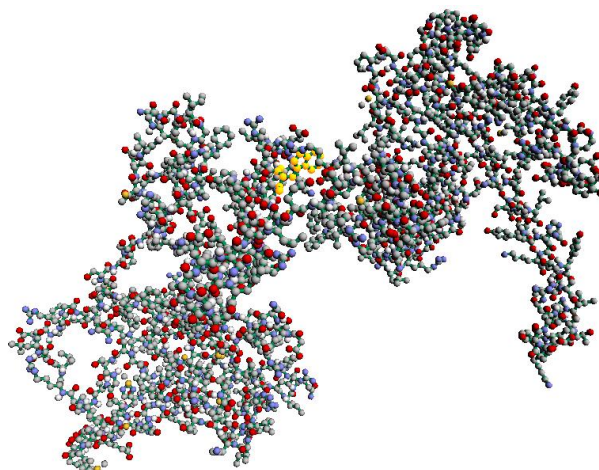


Figura 4.5. Estrutura proteica tridimensional predita de UDP-Apiose/UDP-xilose sintase (AXS) de *Spirodela polyrhiza*. Em amarelo está representado o sítio ativo na posição 185 de aminoácidos da sequência codificante de AXS. A estrutura tridimensional foi predita a partir do Swiss-model® e a atribuição gráfica pelo ProteinScope®.

4.4.2. Obtenção das construções para transformação

A construção de superexpressão pFAST-*SpAXS*-OE apresenta um T-DNA de ~6700 pb sob o controle do promotor 35S e terminador 35S para a transcrição de um produto de 1182 pb (*SpAXS*), apresentando resistência ao herbicida basta (*Bar*) e marcador de fluorescência vermelha (*RGP*) sob o domínio do promotor pOLE e OLE e terminador NOS (**Figura 4.6A**). Já a construção de silenciamento pK7-*SpAXS*_RNAi apresenta um T-DNA de ~6000 pb sob controle do promotor 35S e terminador 35S para a transcrição de um produto de 309 pb no sentido senso e anti-senso (*SpAXS*) intercalado por um íntron de 643 pb, apresentando resistência ao antibiótico canamicina (**Figura 4.6B**).

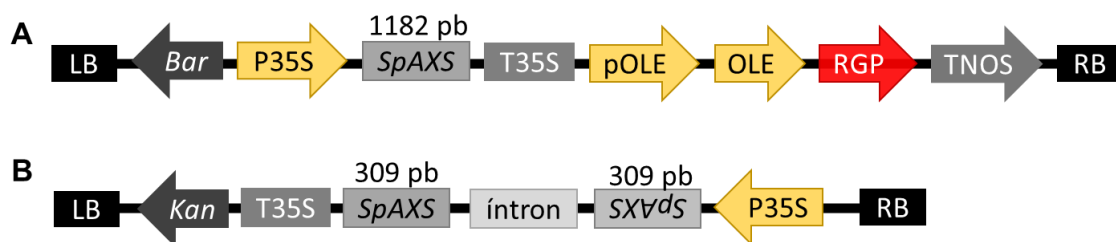


Figura 4.6. Construções de T-DNA para transformações com SpAXS. A. Construção de pFAST-SpAXS-OE, o qual apresenta bordas direita (RB) e esquerda (LB) para a incorporação do cassete contendo promotor 35S (P35S), o gene alvo de interesse contemplando todo cDNA codificante, terminador 35S (T35S), marcador para fluorescência vermelha (RGP) sob promotor pOLE e OLE e terminador Nos (TNOS) e gene para seleção em planta o herbicida Basta (*Bar*). B. Construção de silenciamento pK7-SpAXS-RNAi o qual apresenta bordas direita (RB) e esquerda (LB) para o cassete contendo promotor 35S (P35S), duas porções do gene *SpAXS* de 309 pb intercalado por um íntron, terminador 35S (T35S) e gene para seleção em planta canamicina (*Kan*).

4.4.3. Transformação de frondes de *S. polyrhiza* via *A. tumefaciens*

Antes de transformar *S. polyrhiza* 9509 foi necessária a determinação da toxicidade à canamicina para identificar a concentração de antibiótico que permite a seleção dos transformantes com o vetor de silenciamento. O efeito tóxico da canamicina foi identificado pela clorose das novas plantas e/ou inibição do crescimento que pode ser observado em todas as concentrações testadas (**Figura 4.7**). Porém, o efeito foi mais claro para o crescimento a partir dos 15 mg.L⁻¹ (**Figura 4.7E**). Concentrações mais elevadas também foram testadas (25, 50, 100, 200 e 400 mg.L⁻¹) e todas se mostraram tóxicas com o mesmo fenômeno observado para a concentração de 15-20 mg.L⁻¹ (**Figura 4.7E-F**). Portanto, a concentração 15 mg.L⁻¹ foi determinada para a seleção dos transformantes de silenciamento de *SpAXS* em *S. polyrhiza* 9509.

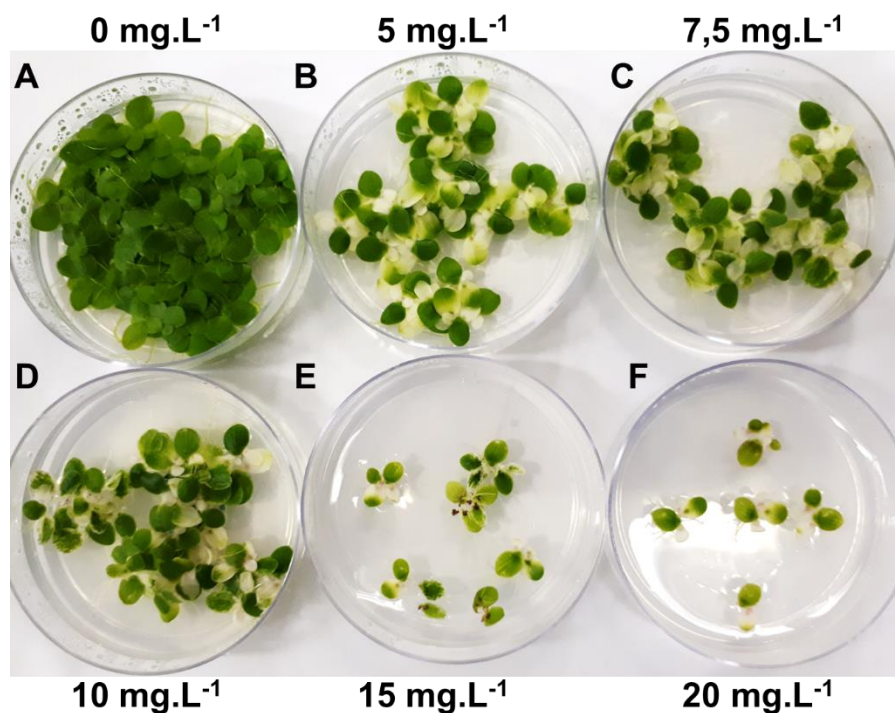


Figura 4.7. Teste de toxicidade de canamicina em *Spirodela polyrhiza* 9509. As imagens foram obtidas após 15 dias inoculação do material vegetal em meio *Schenck-Hildebrandt* incompleto suplementado com 0,5% sacarose e antibiótico canamicina nas concentrações 0; 5; 7,5; 10; 15 e 20 mg.L⁻¹ cultivado em fotoperíodo de dia longo. (n=3).

Foram realizados seis experimentos de transformação com o vetor pK7-SpAXS-RNAi em que 2110 eventos foram conduzidos com uma taxa de sucesso em 0,28%. O evento em que houve a recuperação de plantas que apresentaram crescimento considerável foi identificado como RNAi_SpAXS1_A1. A denominação RNAi remete ao silenciamento por RNA de interferência; *Sp* a espécie *S. polyrhiza*; *AXS1* ao gene silenciado; as letras denominam o experimento e; os números indicam os eventos de regeneração independentes. O evento CTL1 é uma planta transformada com o vetor vazio utilizada como controle. A planta transgênica RNAi_SpAXS1_A1 foi submetida a análise 77, 105 e 119 dias de cultivo pós transformação para verificar a estabilidade do transgene. Na **Figura 4.8** é possível identificar o produto de PCR de ~1000 pb do gene de resistência à canamicina nos três tempos avaliados.

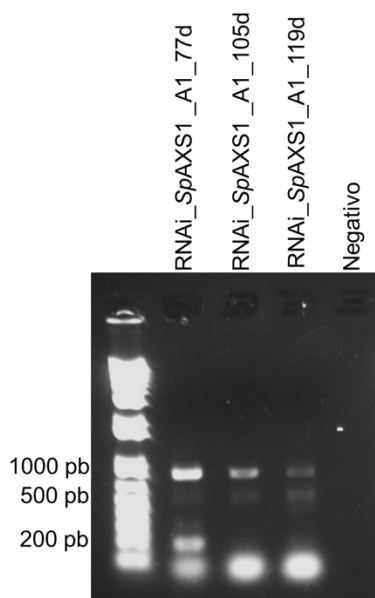


Figura 4.8. Gel de verificação da permanência da resistência à canamicina. As amostras representadas representam diferentes placas de cultivo do transgênico RNAi_SpAXS1_A1 obtidas após 77, 105 e 119 dias após a ocorrência da transformação.

Após confirmação da presença do transgene pela presença de elementos do cassete, foi verificado o nível de expressão do silenciamento de *SpAXS*, o qual não diferiu estatisticamente entre os eventos RNAi_SpAXS1_A1, CTL1 e o selvagem, embora uma tendência de redução de até 75% tenha sido observada (**Figura 4.9A-C**). A enzima codificada por *SpAXS*, UDP-apiose/UDP-xilose sintase está envolvida na síntese de apiose e xilose. Porém, o monossacarídeo xilose têm uma via de síntese independente de apiose, através da descarboxilação de UDP-glucuronato por UDP-glucuronato decarboxilase (*UXS*). Em *S. polyrhiza* existem seis parálogos para o gene *UXS* (**Capítulo I**), dos quais três foram avaliados (*SpUXS2*, *SpUXS4* e *SpUXS5*). Ainda, a principal variação entre as subfamílias de lentilhas d'água está na proporção desses açúcares a constituírem apiogalacturonanos (apiose) e xilogalacturonanos (xilose) (AVCI; PEÑA; O'NEILL, 2018). Dessa forma, é interessante avaliar também a expressão dos genes envolvidos na síntese desses açúcares. Dos parálogos avaliados de *SpUXS*, apenas em *SpUXS5* foi observada uma redução da expressão gênica aos 105 e 119 dias, enquanto maiores níveis de mRNA foram observados para o evento controle CTL1 em relação ao genótipo selvagem (**Figuras 4.9D-L**).

Ao avaliar o conteúdo de apiose na parede celular do evento RNAi_SpAXS1_A1, foi possível identificar uma redução de 44%, 27% e 36%

após 77, 105 e 119 dias de transformação, respectivamente (**Tabela 4.1**). Também foi observada uma redução de 41% no conteúdo de xilose na parede celular de RNAi_SpAXS1_A1 (**Tabela 4.1**). De forma semelhante, todos os outros monossacarídeos estruturais de parede celular avaliados apresentaram redução, i.e. fucose, arabinose, galactose, ramnose, glicose e manose (**Tabela 4.1**), evidenciando uma possível alteração na alocação de carbono à via UDP-glicose destinada à síntese de parede.

Como alternativa à síntese de carboidratos estruturais (via UDP-glicose), há uma via metabólica que desvia para a síntese de amido, chamada de via ADP-glicose. Na **Tabela 4.2**, pode ser visto que o conteúdo de amido foi mantido em RNAi_SpAXS1_A1_77d, reduzindo aos 105d e aumentando aos 119d em relação ao selvagem. Essa flutuação temporal pode estar relacionada a alterações metabólicas pelo estágio de desenvolvimento das plantas. Já os carboidratos não estruturais (glicose, frutose e sacarose) aumentaram em CTL1, enquanto glicose e frutose tenderam a reduzir em RNAi_SpAXS1_A1 (**Tabela 4.2**).

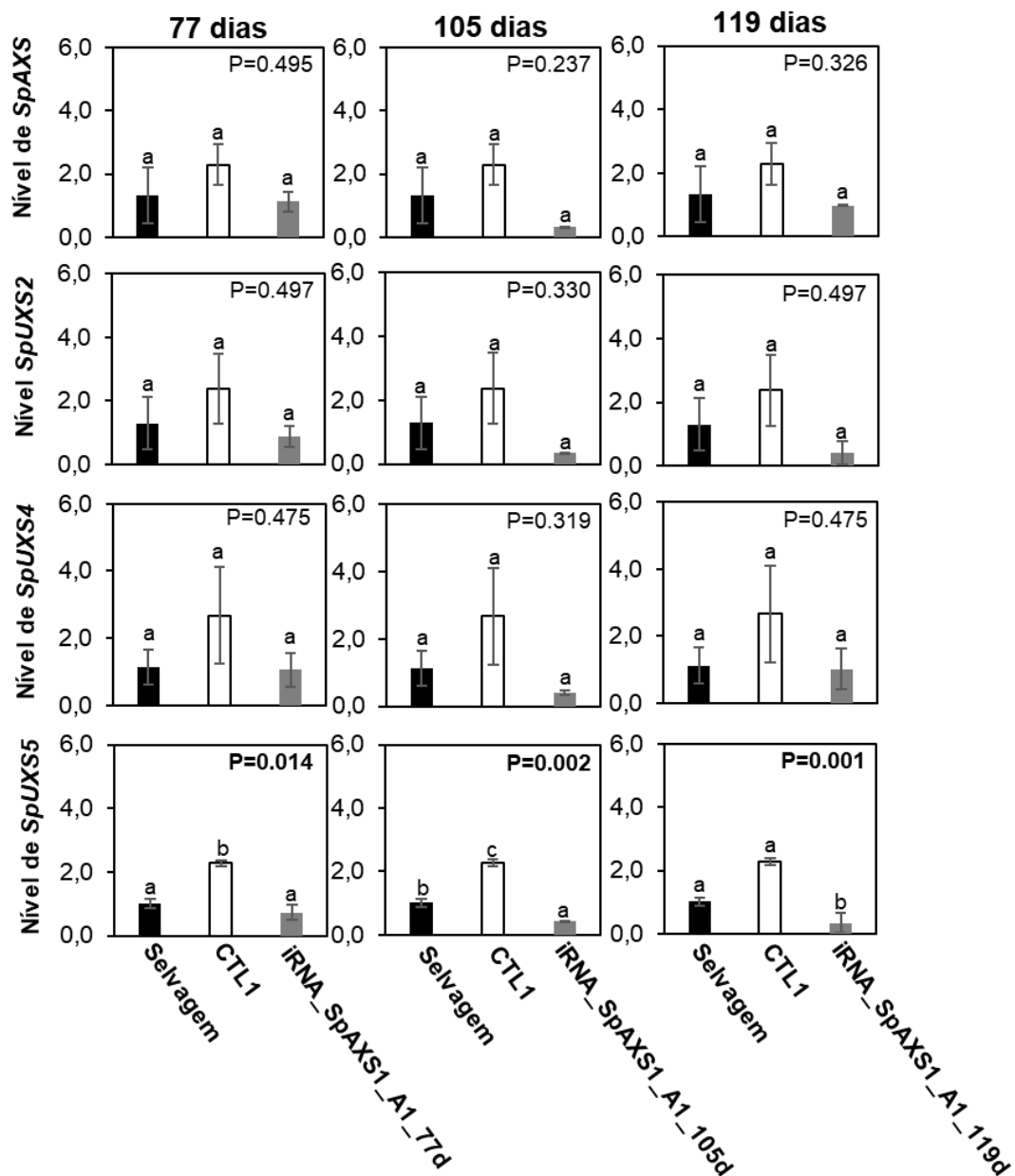


Figura 4.9. Expressão de genes relacionados à síntese de apiogalacturonanos e xilogalacturonanos no evento *iRNA_SpAXS1_A1* de 77, 105 e 119 dias. As amostras avaliadas consistiram no selvagem, plantas transformadas com o vetor vazio (CTL1) e o evento da transformação de silenciamento *SpAXS1_A1* de 77, 105 e 119 dias após a ocorrência da transformação. A figura representa a expressão relativa dos genes envolvidos na síntese de apiose (*SpAXS* -A-C) e xilose (*SpUXS*- G-L). As diferentes letras apresentam diferenças estatísticas segundo ANOVA-one way seguida de análise de comparação de médias por teste de Tukey ($P=0.05$) ($n=3$).

Tabela 4.1. Carboidratos estruturais não-celulósicos de RNAi_SpAXS1_A1 em comparação com o selvagem de *Spirodela polyrhiza*. As diferentes letras apresentam diferenças estatísticas segundo ANOVA-one way seguida de análise de comparação de médias por teste de Tukey (P=0,05) (n=3).

CARBOIDRATOS ESTRUTURAIS ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ parede celular)								
	Fucose	Arabinose	Galactose	Ramnose	Glicose	Xilose	Manose	Apiose
Selvagem	6,6 \pm 0,2 ^b	49,7 \pm 1,5 ^b	66,6 \pm 2,4 ^b	26,3 \pm 0,8 ^b	10,2 \pm 0,5 ^a	48,7 \pm 1,8 ^b	39,5 \pm 0,8 ^b	44,8 \pm 2,5 ^b
CTL1	6,5 \pm 0,2 ^b	48,1 \pm 1,7 ^b	65,7 \pm 5,0 ^b	23,3 \pm 2,8 ^b	11,0 \pm 0,5 ^a	52,3 \pm 3,3 ^b	29,3 \pm 0,7 ^a	47,3 \pm 3,1 ^{ab}
77d	3,1 \pm 0,3 ^a	26,0 \pm 2,1 ^a	43,1 \pm 3,7 ^a	10,5 \pm 0,8 ^a	7,5 \pm 0,2 ^b	28,2 \pm 2,2 ^a	23,4 \pm 2,2 ^a	25,0 \pm 2,2 ^{ab}
p-valor	0,000	0,000	0,008	0,002	0,002	0,001	0,001	0,002
Selvagem	6,6 \pm 0,2 ^b	49,7 \pm 1,5 ^b	66,6 \pm 2,4 ^b	26,3 \pm 0,8 ^b	10,2 \pm 0,5 ^a	48,7 \pm 1,8 ^b	39,5 \pm 0,8 ^c	44,8 \pm 2,5 ^b
CTL1	6,5 \pm 0,2 ^b	48,1 \pm 1,7 ^b	65,7 \pm 5,0 ^b	23,3 \pm 2,8 ^b	11,0 \pm 0,5 ^a	52,3 \pm 3,3 ^b	29,3 \pm 0,7 ^b	47,3 \pm 3,1 ^{ab}
105d	3,1 \pm 0,0 ^a	25,8 \pm 0,4 ^a	39,0 \pm 1,3 ^a	10,8 \pm 0,2 ^a	7,3 \pm 0,4 ^b	28,3 \pm 0,0 ^a	21,2 \pm 1,8 ^a	32,5 \pm 1,4 ^{ab}
p-valor	0,000	0,000	0,002	0,001	0,002	0,005	0,000	0,011
Selvagem	6,6 \pm 0,2 ^b	49,7 \pm 1,5 ^b	66,6 \pm 2,4 ^a	26,3 \pm 0,8 ^b	10,2 \pm 0,5 ^a	48,7 \pm 1,8 ^b	39,5 \pm 0,8 ^c	44,8 \pm 2,5 ^b
CTL1	6,5 \pm 0,2 ^b	48,1 \pm 1,7 ^b	65,7 \pm 5,0 ^a	23,3 \pm 2,8 ^b	11,0 \pm 0,5 ^a	52,3 \pm 3,3 ^b	29,3 \pm 0,7 ^b	47,3 \pm 3,1 ^b
119d	3,0 \pm 0,3 ^a	22,7 \pm 2,3 ^a	53,2 \pm 3,2 ^a	9,2 \pm 1,2 ^a	7,8 \pm 0,7 ^b	25,2 \pm 2,1 ^a	20,1 \pm 2,0 ^a	28,5 \pm 2,0 ^a
p-valor	0,000	0,000	0,076	0,001	0,018	0,005	0,001	0,004

Tabela 4.2. Carboidratos não estruturais de RNAi_SpAXS1_A1 em comparação com o selvagem de *Spirodela polyrhiza*. As diferentes letras apresentam diferenças estatísticas segundo ANOVA-one way seguida de análise de comparação de médias por teste de Tukey (P=0,05) (n=3).

CARBOIDRATOS NÃO ESTRUTURAIS				
($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ massa seca)				
	Glicose	Frutose	Sacarose	Amido
Selvagem	6,1 \pm 1,1 ^a	10,9 \pm 1,8 ^{ab}	12,5 \pm 1,9 ^a	42,8 \pm 3,3 ^b
CTL1	20,8 \pm 1,7 ^b	25,5 \pm 5,3 ^b	26,1 \pm 7,7 ^b	18,6 \pm 0,3 ^a
77d	4,3 \pm 0,5 ^a	9,5 \pm 2,7 ^a	12,5 \pm 1,7 ^a	51,0 \pm 1,3 ^b
p-valor	0,000	0,036	0,001	0,000
Selvagem	6,1 \pm 1,1 ^a	10,9 \pm 1,8 ^{ab}	12,5 \pm 1,9 ^a	42,8 \pm 3,3 ^c
CTL1	20,8 \pm 1,7 ^b	25,5 \pm 5,3 ^b	26,1 \pm 7,7 ^b	18,6 \pm 0,3 ^a
105d	2,1 \pm 0,8 ^a	3,3 \pm 1,9 ^a	6,0 \pm 2,3 ^a	31,2 \pm 2,3 ^b
p-valor	0,000	0,010	0,605	0,001
Selvagem	6,1 \pm 1,1 ^a	10,9 \pm 1,8 ^b	12,5 \pm 1,9 ^a	42,8 \pm 3,3 ^b
CTL1	20,8 \pm 1,7 ^b	25,5 \pm 5,3 ^c	26,1 \pm 7,7 ^b	18,6 \pm 0,3 ^a
119d	2,7 \pm 0,4 ^a	5,2 \pm 0,6 ^a	9,0 \pm 1,1 ^a	73,5 \pm 8,2 ^c
p-valor	0,000	0,011	0,085	0,001

4.4.4. Transformação de *L. minor* por calos via *A. tumefaciens*

O processo de transformação em calos de *L. minor* foi repetido sete vezes com a construção pFAST-SpAXS-OE em que 700 eventos foram conduzidos com uma taxa de sucesso de 1,5%. Embora a taxa de sucesso obtida tenha sido acima do resultado encontrado para a transformação direta de frondes do silenciamento (0,28%), os eventos avaliados, na sua grande maioria, não apresentaram aumento da expressão do alvo *SpAXS*. Dentre os 11 eventos positivos da transformação de superexpressão heteróloga de *SpAXS* em *L. minor*, dois eventos (35S:SpAXS1_A1 e 35S:SpAXS1_B1) serão apresentados. A presença do T-DNA nos dois eventos, 35S::SpAXS1_A1 e 35S::SpAXS1_B1, foi confirmado ao longo do tempo (A1: 52, 64, 81 e B1: 52, 95, 120 dias) para verificar a estabilidade do transgene. Para isso foi realizada uma PCR utilizando iniciadores para o gene de resistência ao herbicida basta (**Figura 4.18**).

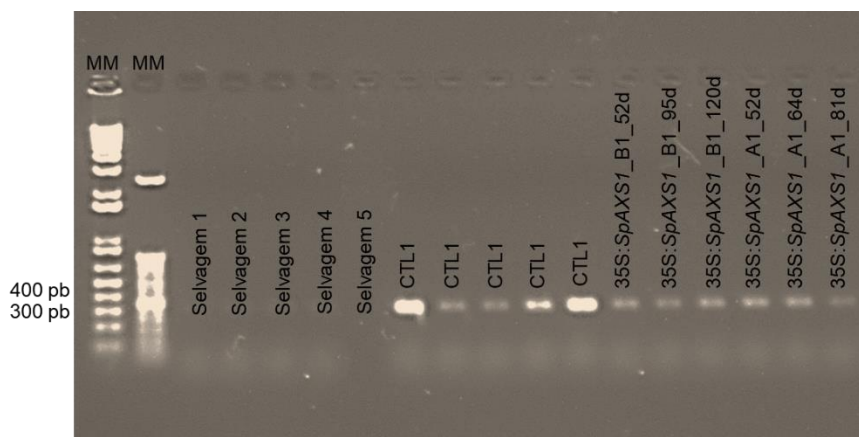


Figura 4.10. Gel de confirmação da transformação de *Lemna minor* pelo teste com resistência ao herbicida basta. Selvagem representa a planta regenerada da cultura de tecidos que não foi transformada, as plantas obtidas da transformação com o vetor vazio estão identificadas como CTL1, eventos estão identificados como 35S:SpAXS1_A1 52, 64, 81d e 35S:SpAXS1_B1 52, 95 e 120d em que os números representam dias após a ocorrência da transformação. MM indica marcador molecular de 1 kB e 50 pb, respectivamente.

Na **Figura 4.10** é possível identificar que todas as amostras avaliadas apresentaram a confirmação para o gene *bar*, o qual confere a resistência ao herbicida basta. A expressão relativa do gene alvo foi verificada para o gene exclusivo de *S. polyrhiza* (*SpAXS*), para ambos eventos, 35S::SpAXS1_A1 e 35S::SpAXS1_B1. Para o evento 35S::SpAXS1_A1, a expressão relativa de *SpAXS* foi maior aos 64 dias após transformação onde se registrou um incremento de 18 vezes em relação ao selvagem, enquanto que aos 81 dias, o

aumento foi de 8 vezes (**Figuras 4.11B e 4.11C**). Já a expressão de 35S::SpAXS1_B1 aumentou aos 52d, 95d e 120d após a transformação em até 8 vezes em relação ao selvagem e 1,5 maior que CTL1 (**Figuras 4.12A, 4.12B e 4.12C**).

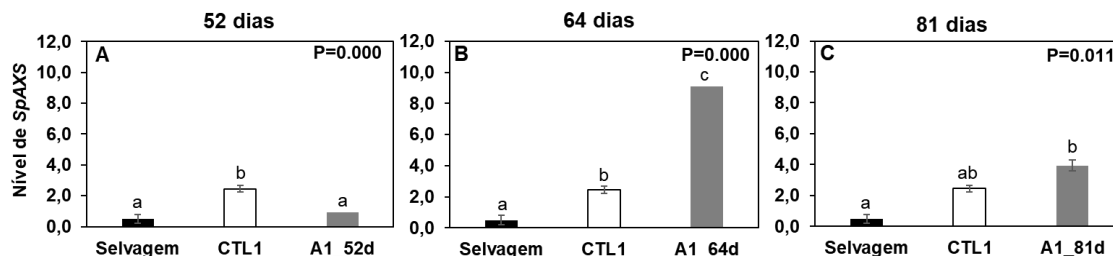


Figura 4.11. Expressão relativa do gene *SpAXS* nos transgênicos 35S::*SpAXS1_A1*. O evento de transgenia foi avaliado em três tempos distintos após o evento de transformação aos 52 dias (A), 64 dias (B) e 81 dias (C) e CTL1 (controle) evento do vetor vazio. Letras distintas no topo das barras indicam diferença estatística pelo teste ANOVA post-hoc Tukey ($p < 0,05$) ($n=3$).

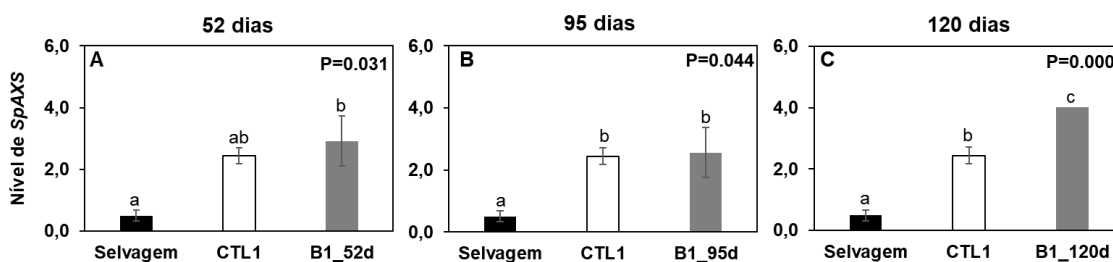


Figura 4.12. Expressão relativa do gene *SpAXS* nos transgênicos 35S::*SpAXS1_B1*. O evento de transgenia foi avaliado em três tempos distintos após o evento de transformação aos 52 dias (A), 95 dias (B) e 120 dias (C) e CTL1 (controle) evento do vetor vazio. Letras distintas no topo das barras indicam diferença estatística pelo teste ANOVA post-hoc Tukey ($p < 0,05$) ($n=3$).

Os carboidratos não estruturais foram reduzidos na sua grande maioria tanto no evento A1 quanto B1 (**Tabela 4.3**). Apenas o evento 35S::SpAXS1_A1_52d, apresentou incremento no conteúdo de sacarose de 48% em relação ao selvagem. Já, o evento B1 apresenta redução no conteúdo de glicose e frutose em relação ao selvagem, com aumento de 82% em sacarose aos 52 dias (**Tabela 4.3**). O amido reduziu em até 50% no evento A1 nos tempos 52 e 81 dias, enquanto no evento B1 a redução foi de 45% (**Tabela 4.3**). Os monossacarídeos estruturais apresentaram redução significativa apenas em xilose (63%) e apiose (67%) no evento 35S::SpAXS1_B1_52d em relação ao selvagem (**Tabela 4.4**).

Tabela 4.3. Carboidratos não estruturais dos eventos de superexpressão SpAXS1_A1 e SpAXS1_B1 em comparação com o selvagem de *Lemna minor*. Letras distintas apresentam diferenças significativas por ANOVA-one way seguida por teste de Tukey (P=0,05) (n=3).

CARBOIDRATOS NÃO ESTRUTURAIS				
	Glicose	Frutose	Sacarose	Amido
Selvagem	9,8 ± 1,7 ^b	16,2 ± 3,2 ^a	13,4 ± 1,6 ^a	38,8 ± 1,0 ^b
CTL1	5,1 ± 0,3 ^a	9,5 ± 0,3 ^a	10,4 ± 1,3 ^a	41,8 ± 0,4 ^b
A1_52d	6,1 ± 0,5 ^{ab}	9,6 ± 0,7 ^a	19,9 ± 0,7 ^b	19,4 ± 2,1 ^a
p-valor	0,043	0,079	0,002	0,000
Selvagem	9,8 ± 1,7 ^b	16,2 ± 3,2 ^b	13,4 ± 1,6 ^a	38,8 ± 1,0 ^a
CTL1	5,1 ± 0,3 ^a	9,5 ± 0,3 ^{ab}	10,4 ± 1,3 ^a	41,8 ± 0,4 ^b
A1_64d	1,3 ± 0,0 ^a	2,7 ± 0,2 ^a	9,3 ± 0,3 ^a	40,4 ± 0,3 ^{ab}
p-valor	0,003	0,007	0,059	0,053
Selvagem	9,8 ± 1,7 ^b	16,2 ± 3,2 ^b	13,4 ± 1,6 ^b	38,8 ± 1,0 ^b
CTL1	5,1 ± 0,3 ^a	9,5 ± 0,3 ^{ab}	10,4 ± 1,3 ^b	41,8 ± 0,4 ^b
A1_81d	2,9 ± 0,0 ^a	4,5 ± 0,1 ^a	4,7 ± 0,2 ^a	22,7 ± 0,5 ^a
p-valor	0,007	0,013	0,002	0,000
Selvagem	9,8 ± 1,7 ^b	16,2 ± 3,2 ^a	13,4 ± 1,6 ^a	38,8 ± 1,0 ^b
CTL1	5,1 ± 0,3 ^a	9,5 ± 0,3 ^a	10,4 ± 1,3 ^a	41,8 ± 0,4 ^b
B1_52d	7,2 ± 0,2 ^{ab}	10,4 ± 0,1 ^a	24,3 ± 1,0 ^b	21,8 ± 0,9 ^a
p-valor	0,045	0,088	0,000	0,000
Selvagem	9,8 ± 1,7 ^b	16,2 ± 3,2 ^b	13,4 ± 1,6 ^a	38,8 ± 1,0 ^b
CTL1	5,1 ± 0,3 ^a	9,5 ± 0,3 ^{ab}	10,4 ± 1,3 ^a	41,8 ± 0,4 ^b
B1_120d	1,9 ± 0,1 ^a	3,3 ± 0,1 ^a	13,3 ± 0,2 ^a	21,1 ± 0,9 ^a
p-valor	0,004	0,008	0,125	0,000

Tabela 4.4. Carboidratos estruturais dos eventos de superexpressão SpAXS1_A1 e SpAXS1_B1 em comparação com o selvagem de *Lemna minor*. Letras distintas apresentam diferenças significativas segundo ANOVA-one way seguida por Tukey (P=0,05) (n=3).

CARBOIDRATOS ESTRUTURAIS (µg.mg ⁻¹ parede celular)								
	Fucose	Arabinose	Galactose	Ramnose	Glicose	Xilose	Manose	Apiose
Selvagem	0,3 ± 0,2 ^a	5,8 ± 0,6 ^a	19,1 ± 2,6 ^a	2,2 ± 0,2 ^a	2,4 ± 0,4 ^a	14,9 ± 1,7 ^a	5,4 ± 0,5 ^a	37,8 ± 2,5 ^a
CTL1	0,1 ± 0,1 ^a	4,6 ± 0,9 ^a	12,0 ± 2,3 ^a	1,8 ± 0,5 ^a	2,6 ± 0,4 ^a	11,7 ± 1,7 ^a	3,8 ± 0,8 ^a	27,8 ± 5,7 ^a
A1_52d	0,1 ± 0,0 ^a	3,5 ± 0,7 ^a	17,4 ± 2,6 ^a	1,2 ± 0,3 ^a	2,2 ± 0,2 ^a	11,1 ± 1,9 ^a	4,7 ± 0,9 ^a	24,4 ± 4,0 ^a
p-valor	0,402	0,163	0,194	0,242	0,695	0,329	0,366	0,150
Selvagem	0,3 ± 0,2 ^a	5,8 ± 0,6 ^a	19,1 ± 2,6 ^a	2,2 ± 0,2 ^a	2,4 ± 0,4 ^a	14,9 ± 1,7 ^a	5,4 ± 0,5 ^a	37,8 ± 2,5 ^a
CTL1	0,1 ± 0,1 ^a	4,6 ± 0,9 ^a	12,0 ± 2,3 ^a	1,8 ± 0,5 ^a	2,6 ± 0,4 ^a	11,7 ± 1,7 ^a	3,8 ± 0,8 ^a	27,8 ± 5,7 ^a
A1_64d	0,4 ± 0,4 ^a	5,0 ± 1,3 ^a	10,7 ± 3,0 ^a	1,6 ± 0,7 ^a	2,9 ± 0,8 ^a	15,8 ± 3,3 ^a	4,4 ± 1,3 ^a	50,9 ± 9,0 ^a
p-valor	0,660	0,717	0,132	0,769	0,848	0,471	0,512	0,105
Selvagem	0,3 ± 0,2 ^a	5,8 ± 0,6 ^a	19,1 ± 2,6 ^a	2,2 ± 0,2 ^a	2,4 ± 0,4 ^a	14,9 ± 1,7 ^a	5,4 ± 0,5 ^a	37,8 ± 2,5 ^{ab}
CTL1	0,1 ± 0,1 ^a	4,6 ± 0,9 ^a	12,0 ± 2,3 ^a	1,8 ± 0,5 ^a	2,6 ± 0,4 ^a	11,7 ± 1,7 ^a	3,8 ± 0,8 ^a	27,8 ± 5,7 ^a
A1_81d	0,3 ± 0,1 ^a	5,2 ± 0,2 ^a	17,5 ± 0,7 ^a	1,8 ± 0,1 ^a	2,3 ± 0,1 ^a	15,9 ± 0,9 ^a	4,7 ± 0,3 ^a	44,6 ± 2,1 ^b
p-valor	0,403	0,487	0,109	0,692	0,800	0,195	0,225	0,054
Selvagem	0,3 ± 0,2 ^a	5,8 ± 0,6 ^a	19,1 ± 2,6 ^a	2,2 ± 0,2 ^a	2,4 ± 0,4 ^a	14,9 ± 1,7 ^b	5,4 ± 0,5 ^a	37,8 ± 2,5 ^b
CTL1	0,1 ± 0,1 ^a	4,6 ± 0,9 ^a	12,0 ± 2,3 ^a	1,8 ± 0,5 ^a	2,6 ± 0,4 ^a	11,7 ± 1,7 ^b	3,8 ± 0,8 ^a	27,8 ± 5,7 ^{ab}
B1_52d	0,0 ± 0,0 ^a	2,5 ± 0,9 ^a	24,8 ± 4,2 ^a	0,8 ± 0,3 ^a	2,3 ± 0,5 ^a	5,5 ± 0,7 ^a	6,0 ± 2,0 ^a	12,3 ± 1,9 ^a
p-valor	0,470	0,164	0,820	0,179	0,752	0,008	0,533	0,007
Selvagem	0,3 ± 0,2 ^a	5,8 ± 0,6 ^a	19,1 ± 2,6 ^a	2,2 ± 0,2 ^a	2,4 ± 0,4 ^a	14,9 ± 1,7 ^a	5,4 ± 0,5 ^a	37,8 ± 2,5 ^a
CTL1	0,1 ± 0,1 ^a	4,6 ± 0,9 ^a	12,0 ± 2,3 ^a	1,8 ± 0,5 ^a	2,6 ± 0,4 ^a	11,7 ± 1,7 ^a	3,8 ± 0,8 ^a	27,8 ± 5,7 ^a
B1_120d	0,0 ± 0,0 ^a	3,1 ± 0,5 ^a	13,4 ± 1,8 ^a	0,8 ± 0,2 ^a	1,4 ± 0,2 ^a	9,3 ± 1,0 ^a	3,4 ± 0,6 ^a	24,9 ± 2,6 ^a
p-valor	0,470	0,243	0,434	0,143	0,125	0,114	0,738	0,161

4.4.5. Transformação de calos de *L. minor* via biobalística

O método de transformação direta por biobalística foi realizado em calos de *L. minor* 8627 tanto para a superexpressão quanto para o silenciamento do gene *SpAXS*. Após 3 meses do processo, os calos ainda não regeneraram, portanto, decidiu-se avaliar a expressão gênica do alvo de interesse e a bioquímica da parede celular nos explantes. A confirmação das transformações foi realizada com a amplificação do fragmento do gene canamicina (**Figura 4.13A**) e basta (**Figura 4.13B**) em pools de calos. Os pools foram gerados com a inclusão de segmentos globulares de todas as placas submetidas a biobalística que passaram pelo processo de seleção (**Figura 4.14**).

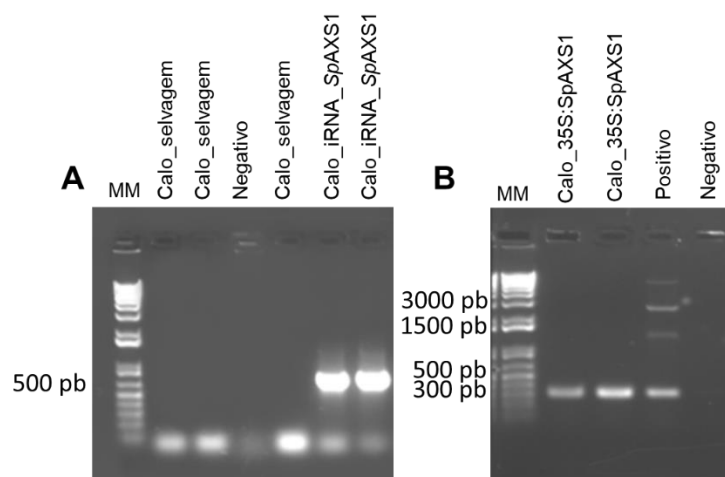


Figura 4.13. Gel de confirmação da transformação de calos *Lemna minor* por biobalística pelo teste com resistência ao antibiótico canamicina (A) e ao herbicida basta (B). MM indica marcador molecular de 1 Kb.

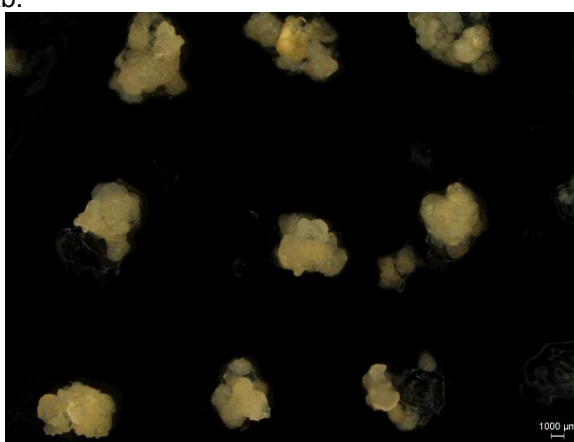


Figura 4.14. Calos de *L. minor* 8627 transformados por biobalística. Barra branca representa 1000 μm.

O evento de silenciamento apresentou uma redução de 97% na expressão de *SpAXS* (**Figura 4.15A**). Por outro lado, o evento de superexpressão não apresentou aumento significativo (**Figura 4.15B**).

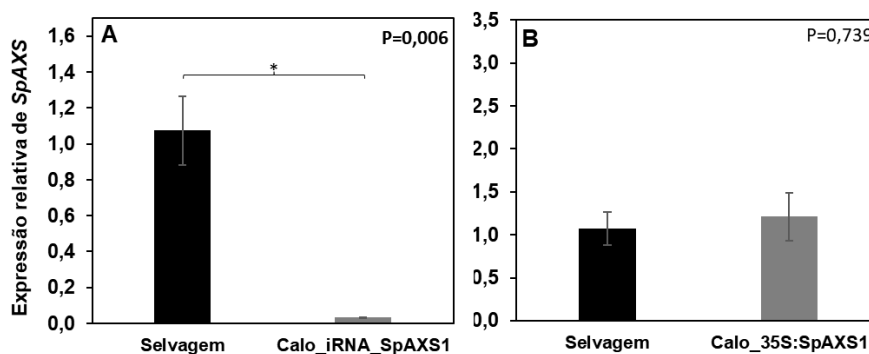


Figura 4.15. Comparação da expressão relativa do gene *SpAXS* nos calos obtidos pelo método de biobalística. Foram avaliados o nível de expressão do evento de silenciamento (A) e superexpressão (B). Asteriscos indicam diferença pelo teste t-Student ($p < 0.05$) ($n=3$).

O conteúdo de monossacarídeos foi alterado para o evento de silenciamento, de tal forma que o conteúdo de todos os açúcares avaliados (fucose, arabinose, galactose, ramnose, glicose, xilose, manose e apiose) foram reduzidos (**Figura 4.16A**), enquanto o conteúdo dos açúcares do evento de superexpressão não sofreu alteração em relação ao selvagem (**Figura 4.16B**). O conteúdo de apiose nos calos de silenciamento foi reduzido em 62,7% ($0,78 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ massa fresca) e a xilose em 48,9% ($0,46 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ massa fresca) em relação ao selvagem ($2,09 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ massa fresca e $0,90 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ massa fresca) (**Figura 4.16A**).

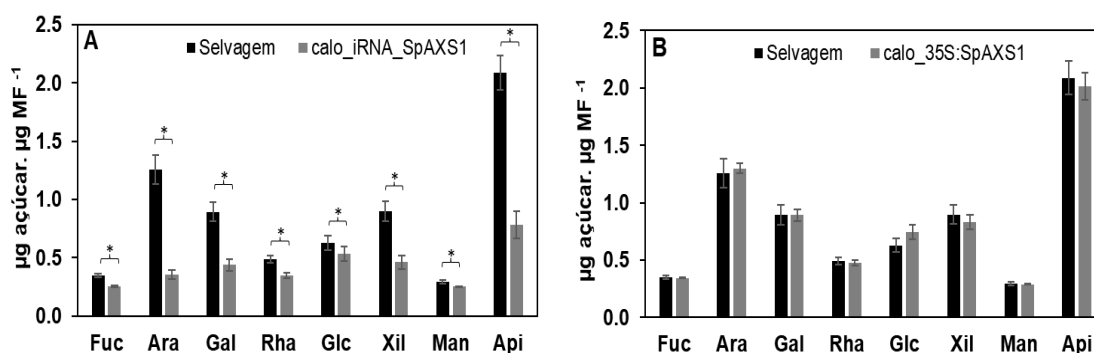


Figura 4.16. Composição de monossacarídeos de calos de *Lemna minor* 8627 submetidos a transformação por biobalística do cassete de silenciamento (A) e superexpressão (B). As diferentes letras apresentam diferenças estatísticas segundo Teste-t ($P=0.05$) ($n=3$). Fuc = fucose, Ara = arabinose, Gal = galactose, Rha = ramnose, Xil = xilose, Man = manose, Api = apiose, MF= massa fresca.

4.5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento da biotecnologia de plantas permitiu o aprimoramento de técnicas e protocolos, para que organismos com características benéficas

para a sociedade possam ser criados através de introdução direcional de genes de forma rápida. Neste sentido, a aplicação de técnicas biotecnológicas potencializa diversas aplicações industriais das lentilhas d'água.

As lentilhas d'água apresentam em sua parede celular elevados teores de apiose (AVCI; PEÑA; O'NEILL, 2018; MOHNEN, 2008) e esse açúcar tem correlação positiva com a predisposição de crescimento e negativa com o acúmulo de amido (PAGLIUSO et al., 2018). Portanto, especula-se que a abundância de apiose das lentilhas d'água permite o armazenamento de elevados teores de boro resultando em uma alta taxa de crescimento e alocação de carboidratos para a via UDP-glicose. Para testar essa hipótese, foram obtidas e caracterizadas plantas transgênicas de *S. polyrhiza* e *L. minor* silenciadas ou superexpressando o gene *SpAXS*, gene que codifica a enzima responsável pela síntese de UDP-apiose, precursor para a produção de apiose.

4.5.1. Técnicas de transformação e as respostas em lentilhas d'água

Para desenvolver este trabalho, foi necessário estabelecer um protocolo de transformação genética. O processo de transformação envolve diversas etapas: a seleção do tecido/órgão a ser utilizado como explante, a introdução do transgene nas células seja via *A. tumefaciens* ou biobalística, a seleção *in vitro* das células transformadas, a regeneração de plantas transgênicas a partir das células transformadas e, finalmente, a genotipagem para verificação da presença do transgene. O método de transformação é altamente dependente do genótipo e, conseqüentemente, para cada espécie e variedade, a capacidade e eficiência de processo está diretamente relacionada ao tipo do explante e condições de regeneração do mesmo (KAUSCH et al., 2019). A transformação mediada por *A. tumefaciens* é o mais empregado em lentilhas d'água, uma vez que é o mais eficiente (DAI et al., 2001). Já o processo de regeneração pode ser indireto, transformando-se calos que posteriormente dão origem às plantas, ou direto quando são utilizados frondes para a transformação (YANG et al., 2018).

O processo de transformação via frondes tem algumas vantagens sobre o sistema de calos, pela eficiência e tempo dispensado (YANG et al., 2021). Porém, diversos estudos relatam transformações transientes quando não utilizam a indução de calos e regeneração de plântulas (BOEHM et al., 2001;

HEENATIGALA et al., 2018; KRUSE et al., 2002). Transformações realizadas de forma direta por biobalística em *W. arrhiza* e *W. columbiana* relatam transformações transientes com a transformação do gene repórter *uid* (KHVATKOV et al., 2015a, 2015b; KRUSE et al., 2002). Infelizmente, as transformações realizadas por biobalística não geraram plantas, decorrente da viabilidade dos calos empregados no processo de transformação. Sabe-se que apenas 30% dos calos regeneram após o processo de transformação. O processo de biobalística foi conduzido com calos de estoque de ~5 meses e ~3 meses, porém as plantas não se desenvolveram a partir desses, mesmo para o calo selvagem. Novos calos foram induzidos e submetidos a regeneração, concomitantemente com a regeneração do sistema de biobalística. Enquanto os novos calos geraram plantas, os calos antigos transformados não regeneraram. Essas observações indicaram problemas de regeneração no sistema de cultura de tecidos e não no processo de transformação.

Plantas com transformação estável de várias espécies de lentilhas d'água (*S. polyrhiza* (EDELMAN et al., 2007), *S. oligorrhiza* (RIVAL et al., 2008; VUNSH et al., 2007), *Lemna gibba* (STOMP; RAJBHANDARI, 2000; YAMAMOTO et al., 2001), *Lemna minor* (CHHABRA et al., 2011; GASDASKA; SPENCER; DICKEY, 2003), *Wolffia arrhiza* (KHVATKOV et al., 2015a) e *Wolffia globosa* (HEENATIGALA et al., 2018)) foram obtidas através dos calos e regeneração de plântulas. Sendo assim, a determinação de ecótipos que respondam de forma eficiente e reprodutível à cultura de tecidos são essenciais para uma transformação estável.

Além do sistema de transformação e do explante usado para a obtenção de transgênicos, elementos que constituem a construção gênica podem também influenciar a resposta nas plantas. Os elementos que constituem o cassete de silenciamento (vetor pK7GWIWIG2) e de superexpressão (pFASTR02) podem estar influenciando o sistema de transgenia, visto que o evento CTL1 se comportam de forma alterada, assim como o evento carregando a construção RNAi_SpAXS1_A1 (**Figuras 4.9 e Tabelas 4.1 e 4.2**) e 35S::SpAXS1_A1 e 35S::SpAXS1_B1 (**Figuras 4.11 e 4.12 e Tabelas 4.3 e 4.4**). A expressão de um transgene não ocorre de maneira uniforme nas plantas, tendo peculiaridades e respostas diferentes de acordo com o promotor e o marcador da seleção

(GRUNENVALDT et al., 2015). O promotor empregado (35S) é caracterizado pela expressão constitutiva em altos níveis de expressão do transgene em monocotiledôneas e eudicotiledôneas, sendo um dos mais amplamente usados na transformação (BATTEW; HALL, 1990; POTENZA; ALEMAN; SENGUPTA-GOPALAN, 2004). Entretanto, promotores constitutivos podem causar um aumento desnecessário do transgene que acabam interferindo em outras rotas metabólicas levando a alterações fenotípicas (DE PAOLI et al., 2007). No caso deste trabalho, o gene alvo de estudo é de cópia única com provável importância crucial para o desenvolvimento. Sendo assim, é possível que o promotor possa provocar anormalidades no desenvolvimento das plantas transgênicas.

Apesar de diversos protocolos de transformação em lentilhas d'água estejam disponíveis na literatura, poucas espécies e ecótipos são contemplados. Além disso, a baixa taxa de eficiência e o longo tempo para a obtenção de um transgênico requerem mais estudos sobre o desenvolvimento do sistema de transformação em lentilhas d'água (YANG et al., 2019). A disponibilidade na literatura de “*transformação em lentilhas d'água*” por bibliometria indicou poucos trabalhos (24 artigos), sendo na sua grande maioria a descrição de protocolos e validações com gene repórter. Das demais transformações, são empregados genes heterólogos de importância econômica, usando as lentilhas d'água apenas como biofábricas e não para alterar alguma característica própria. O sistema utilizado de transformação por frondes em *S. polyrhiza* precisa de ajustes, uma vez que a planta demonstra respostas anormais após inserção do vetor vazio, que não deveria apresentar resposta. As transformações de calos de *L. minor* podem apresentar quimeras nas plantas transformadas que, dependendo da parte do tecido coletado de uma única placa, podem levar a resultados distintos. Além disso, a idade do explante e a manutenção muito longa da cultura de calos pode levar a variações somaclonais, do ecótipo e do genótipo inicial (KAUSCH et al., 2019). Esses resultados foram vistos nos eventos A e B da superexpressão em *L. minor*, que apresentam conteúdo reduzido de amido, xilose (B1_52 dias) e apiose (A1_81 dias e B1_52 dias) em relação ao selvagem (**Tabelas 4.3 e 4.4**). E ainda, a cultura de tecidos precisa de ajustes de eficiência para que eventos de transformação de *L. minor* com finalidade comercial sejam

mais assertivos e eficazes (vide não regeneração dos calos submetidos a biobalística).

4.5.2. AXS e o desenvolvimento de lentilhas d'água

A apiose é um açúcar de cinco carbonos oriundo da via UDP-glicose de síntese dos nucleotídeos açúcares, o qual é sintetizado a partir da oxidação de UDP-glicose em UDP-ácido glucurônico por UDP-glicose desidrogenase (UGD; EC. 1.1.1.22), seguida da descarboxilação oxidativa e oxidação de álcool pela UDP-APIOSE/UDP-XILOSE SINTASE (AXS, EC. 4.1.1.35) para formar UDP-apiose (SAVINO et al., 2019). O processo de regulação e a transferência desse nucleotídeo açúcar para os polissacarídeos ainda são pouco conhecidos (PIČMANOVÁ; MØLLER, 2016), assim como sua função no desenvolvimento de parede celular de lentilhas d'água.

O silenciamento de *SpAXS* tanto em frondes de *S. polyrhiza* quanto em calos de *L. minor* reduziram o dreno de carbono para a síntese de parede celular e conseqüentemente reduziu, em números absolutos, todos os monossacarídeos de parede (apiose, xilose, arabinose, fucose, galactose, glicose, arabinose e manose) (**Tabela 4.2 e Figura 4.16**). Contudo, em tabaco os monossacarídeos permaneceram inalterados (AHN et al., 2006) e em *knock-out* do gene em *A. thaliana* houve redução apenas os monossacarídeos que compõem as pectinas (ZHAO et al., 2020). O desvio da via UDP foi provavelmente direcionado para a via ADP-glicose, responsável pela síntese do amido (**Tabelas 4.1**). Interessantemente, no evento de silenciamento (RNAi_*SpAXS1_A1*) a resposta do conteúdo de amido foi ambígua tendo aumento em 19% aos 77d e redução de 27% em aos 105d (**Tabela 4.1**), possivelmente devido à natureza cíclica da síntese de amido, desenvolvimento da planta e aos mecanismos de controle (STITT; ZEEMAN, 2012). O inverso pode ser observado nos eventos de superexpressão, em que os monossacarídeos permaneceram constantes (**Tabela 4.4**) e o amido reduziu em 45% (**Tabela 4.3**). O aumento de amido nos eventos de silenciamento corrobora o reportado por Ahn et al. (2006) em análise do silenciamento do gene *AXS* em *N. benthamiana*.

Os eventos de silenciamento mostram uma redução de 9-97% na expressão de AXS (**Figuras 4.9 e 4.15**) e a superexpressão aumentou de 13-1732% (**Figuras 4.11, 4.12 e 4.15**). Contudo, a alteração na expressão do gene AXS não se correlaciona com a apiose (**Tabelas 4.2 e 4.4**). Essa desconexão pode estar relacionada ao distanciamento entre o processo de transcrição gênica e atividade metabólica das enzimas. Ou seja, para que o monossacarídeo seja incorporado na parede existem diversas glicosil sintases e transferases envolvidas no processo, bem como mecanismos de controle pós-transcricional. O mecanismo de transferência de UDP-apiose à cadeia de ramnogalacturonano ou de apiogalacturonano é desconhecido e talvez, para elucidação completa da formação desses polissacarídeos, seja necessário um transgênico que aumente tanto o precursor (AXS) quanto o transferidor (apiosiltransferase) para que um fenótipo mais evidente possa ser identificado.

O gene AXS pertence à classe das pectinas, portanto espera-se que ocorra alteração nesses polissacarídeos. Além disso, um dos açúcares que precisa ser observado é a xilose, pelo fato de que a enzima AXS tem bifuncionalidade para a síntese de UDP-apiose e UDP-xilose (SAVINO et al., 2019). As lentilhas d'água apresentam diferenças em suas subfamílias em relação a proporção de apiose e xilose na parede, o que pode indicar diferenças na alocação de carbono na via dos nucleotídeos-açúcares (AVCI; PEÑA; O'NEILL, 2017, PAGLIUSO et al., 2018). Como mencionado anteriormente, a xilose pode ser sintetizada independentemente de AXS, pela ação de UDP-glucuronato descarboxilase (UXS) através da conversão de UDP-glucuronato em UDP-xilose (FEINGOLD; NEUFELD; HASSID, 1958; HARPER; BAR-PELED, 2002). Para o alvo *SpUXS5* foi observada uma tendência de redução da expressão gênica nos eventos de silenciamento de frondes de *S. polyrhiza* (**Figuras 4.9**), corroborando com a redução de 41% de xilose (**Tabela 4.2**), diferentemente do aumento de 33% relatado por Zhao et al. (2020).

AXS regula o nível de UDP-apiose e conseqüentemente, regula a formação de dímeros RG-II borato, o qual afeta o desenvolvimento da planta (ZHAO et al., 2020). Mutantes de *A. thaliana mur1* apresentam modificação na síntese de fucose, ocasionando redução da dominância apical, bem como, apresenta maiores teores de RG-II monoméricos e perturbações na parede

celular (REITER; CHAPPLE; SOMERVILLE, 1993). Essa perturbação está relacionada a não formação do complexo RG-II borato, fazendo com que as plantas apresentem sintomas de deficiência de boro (REITER; CHAPPLE; SOMERVILLE, 1993). A deficiência foi revertida quando esses mutantes *mur1* foram suplementados com boro (REITER; CHAPPLE; SOMERVILLE, 1993), contudo o mesmo não aconteceu com os mutantes do gene *AXS* (ZHAO et al., 2020). A recuperação se deve ao fato de que o requerimento de boro está correlacionado com o conteúdo de RG-II presente na parede (ISHII; MATSUNAGA; HAYASHI, 2001) e conseguindo reestruturar esses polissacarídeos, a planta consegue se desenvolver normalmente. Além disso, as cadeias de RG-II se conectam para formar a rede tridimensional das pectinas, colaborando para a manter a porosidade (AHN et al., 2006) e a força de tensão da parede (RYDEN et al., 2003). Essas evidências demonstram a essencialidade de *AXS* no desenvolvimento, e foi observado que nas lentilhas d'água a resposta da modificação de parede ocorre de forma diferenciada.

Longland et al. (1979) verificaram que em turions (forma dormente da fronde de *S. polyrhiza*) o conteúdo de apiose é quase zero. A alteração do dreno de UDP- ácido glucurônico destinado a UDP-apiose é substituído para a síntese de UDP-arabinose e UDP-xilose (LONGLAND; FRY; TREWAVAS, 1989). Ainda, quando foi avaliada a composição de monossacarídeos, todos tiveram redução significativa, com exceção de glicose que aumentou 9 vezes, indicando modificações em ramificações de polissacarídeos, ou ainda, deposição de calose (LONGLAND; FRY; TREWAVAS, 1989). Vale lembrar que quando as lentilhas d'água estão em seu estado dormente, reduzem o conteúdo de apiose, cessam o seu crescimento, aerênquimas nas frondes são reduzidos, e aumenta amido. Essas modificações tornam essas plantas mais densas que a água, submergindo os indivíduos que contribui para a sobrevivência em situações de estresse (e.g. temperaturas e salinidade) (APPENROTH; TELLER; HORN, 1996; OLÁH; HEPP; MÉSZÁROS, 2016; PERRY; APRIL, 1968; SMART; TREWAVAS, 1983; WANG; WU; MESSING, 2014). Esse fenômeno foi parcialmente identificado nos transgênicos aqui descritos, uma vez que plantas submetidas ao silenciamento, reduziram o seu dreno de parede com acúmulo de amido, enquanto plantas submetidas a superexpressão não apresentam alteração no

conteúdo de parede, com redução de amido. Mesmo assim, não foi possível avaliar a relação dos fenótipos encontrados do transgene de *SpAXS* com o crescimento, uma vez que o processo de transformação por si só, influenciou o desenvolvimento no qual o acúmulo de biomassa foi reduzido e não recuperado.

4.6. CONCLUSÕES

O processo de transformação em lentilhas d'água ainda precisa ser aprimorando visando o aumento da eficiência, estabilização e reprodutibilidade. Contudo, foi possível a obtenção de transgênicos tanto de silenciamento quanto de superexpressão de *SpAXS* (em *S. polyrhiza* e *L. minor*), os quais apresentaram redução do dreno da parede e não alteram sua composição. Isso indica um possível controle pós-transcricional e/ou passos subsequentes da via dos nucleotídeos açúcares que precisam ser elucidados para a formação de polissacarídeos com apiose.

4.7. REFERÊNCIAS

- ACOSTA, K. et al. Return of the Lemnaceae: duckweed as a model plant system in the genomics and postgenomics era. **Plant Cell**, v. 33, n. 10, p. 3207–3234, 2021.
- AHMAD, W. et al. Role of boron in plant growth: a review. **J. Agric. Res**, v. 47, n. 3, p. 329–338, 2008.
- AHN, J. W. et al. Depletion of UDP-D-apiose/UDP-D-xylose synthases results in rhamnogalacturonan-II deficiency, cell wall thickening, and cell death in higher plants. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 19, p. 13708–13716, 12 maio 2006.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.
- AMARAL, L. I. V. DO et al. **Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais** *Hoehnea*. [s.l.: s.n.].
- APPENROTH, K. J.; TELLER, S.; HORN, M. Photophysiology of turion formation and germination in *Spirodela polyrhiza*. **Biologia plantarum**, v. 38, n. January 1995, p. 95–106, 1996.
- AVCI, U. et al. Changes in the abundance of cell wall apiogalacturonan and xylogalacturonan and conservation of rhamnogalacturonan II structure during the diversification of the Lemnoideae. **Planta**, v. 247, n. 4, p. 953–971, 1 abr. 2018.
- AVCI, U.; PEÑA, M. J.; O'NEILL, M. A. Changes in the abundance of cell wall apiogalacturonan and xylogalacturonan and conservation of

rhamnogalacturonan II structure during the diversification of the Lemnoideae. **Planta**, n. 0123456789, 2017.

AVCI, U.; PEÑA, M. J.; O'NEILL, M. A. Changes in the abundance of cell wall apiogalacturonan and xylogalacturonan and conservation of rhamnogalacturonan II structure during the diversification of the Lemnoideae. **Planta**, v. 247, n. 4, p. 953–971, 2018.

BAR-PELED, M.; O'NEILL, M. A. Plant Nucleotide Sugar Formation, Interconversion, and Salvage by Sugar Recycling*. **Annual Review of Plant Biology**, v. 62, n. 1, p. 127–155, 2 jun. 2011.

BATTRAW, M. J.; HALL, T. C. Histochemical analysis of CaMV 35S promoter- β -glucuronidase gene expression in transgenic rice plants. **Plant Molecular Biology**, v. 15, n. 4, p. 527–538, out. 1990.

BAUM, J. A. et al. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 11, p. 1322–1326, 4 nov. 2007.

BERTRAN, K. et al. Expression of H5 hemagglutinin vaccine antigen in common duckweed (*Lemna minor*) protects against H5N1 high pathogenicity avian influenza virus challenge in immunized chickens. **Vaccine**, v. 33, n. 30, p. 3456–3462, 9 jul. 2015.

BOEHM, R. et al. A transient transformation system for duckweed (*Wolffia columbiana*) using *Agrobacterium*-mediated gene transfer. **Journal of Applied Botany**, v. 75, n. 3–4, p. 107–111, 2001.

CANTÓ-PASTOR, A. et al. Efficient transformation and artificial miRNA gene silencing in *Lemna minor*. **Plant Biology**, v. 17, n. s1, p. 59–65, 1 jan. 2015.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. 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**, v. 3, n. 1, p. 1–30, 1993.

CHANDA, S.; BHADURI, S. K.; SARDAR, D. Chemical characterization of pressed fibrous residues of four aquatic weeds. **Aquatic Botany**, v. 42, n. 1, p. 81–85, 1991.

CHHABRA, G. et al. Genetic transformation of Indian isolate of *Lemna minor* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and recovery of transgenic plants. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 17, n. 2, p. 129–136, abr. 2011.

COX, K. M. et al. Glycan optimization of a human monoclonal antibody in the aquatic plant *Lemna minor*. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1591–1597, 26 dez. 2006.

DAI, S. et al. Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. **Molecular Breeding** 2001 7:1, v. 7, n. 1, p. 25–33, 2001.

DE PAOLI, L. G. et al. Transformação genética de laranja “Valência” com o gene cecropin MB39. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 11, p. 1663–1666, nov. 2007.

EDELMAN, I. M. et al. (12) United States Patent. v. 316, n. 12, p. 1194–1199, 2007.

EDWARDS, K.; JOHNSTONE, C.; THOMPSON, C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 6, p. 1349, 1991.

EMMS, D. M.; KELLY, S. OrthoFinder: solving fundamental biases in whole genome comparisons dramatically improves orthogroup inference accuracy. **Genome Biology**, v. 16, n. 1, p. 157, 6 ago. 2015.

FEINGOLD, D. S.; NEUFELD, E. F.; HASSID, W. Z. Enzymic synthesis of uridine diphosphate glucuronic acid and uridine diphosphate galacturonic acid with extracts from *Phaseolus aureus* seedlings. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 78, n. 2, p. 401–406, 1958.

FIRSOV, A. et al. Expression and Immunogenicity of M2e Peptide of Avian Influenza Virus H5N1 Fused to Ricin Toxin B Chain Produced in Duckweed Plants. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, n. February, p. 1–11, 2018.

GASDASKA, J.; SPENCER, D.; DICKEY, L. Advantages of Therapeutic Protein Production in the Aquatic Plant Lemna. **BioProcessing Journal**, v. 2, n. 2, p. 49–56, 30 abr. 2003.

GRUNENVALDT, R. L. et al. **Promotors Used in Genetic Transformation of Plants** *Research Journal of Biological Sciences*, 2015. Disponível em: <<http://docsdrive.com/pdfs/medwelljournals/rjbsci/2015/1-9.pdf>>

HALL, T. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. **GERF Bulletin of Bioscience**, v. 2, n. 1, p. 60–61, 2011.

HARPER, A. D.; BAR-PELED, M. Biosynthesis of UDP-Xylose. Cloning and Characterization of a Novel Arabidopsis Gene Family, UXS, Encoding Soluble and Putative Membrane-Bound UDP-Glucuronic Acid Decarboxylase Isoforms. **Plant Physiology**, v. 130, n. 4, p. 2188, 1 dez. 2002.

HART, D. A.; KINDEL, P. K. Isolation and partial characterization of apiogalacturonans from the cell wall of *Lemna minor*. **The Biochemical journal**, v. 116, n. 4, p. 569–579, fev. 1970.

HARTLEY, J. L.; TEMPLE, G. F.; BRASCH, M. A. SITE-SPECIFIC-RECOMBINATION-HARTLEY.pdf. p. 1788–1795, 2000.

HEENATIGALA, P. P. M. et al. Development of efficient protocols for stable and transient gene transformation for *Wolffia Globosa* using *Agrobacterium*. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, n. JUN, p. 1–10, 2018.

HUVENNE, H.; SMAGGHE, G. **Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review** *Journal of Insect Physiology*, mar. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19837076>>. Acesso em: 10 abr. 2020

ISHII, T.; MATSUNAGA, T.; HAYASHI, N. Formation of rhamnogalacturonan II-borate dimer in pectin determines cell wall thickness of pumpkin tissue. **Plant**

Physiol., v. 126, n. 4, p. 1698–1705, 2001.

JEFFERSON, R. A. Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. **Plant Molecular Biology Reporter** **1987** **5:4**, v. 5, n. 4, p. 387–405, dez. 1987.

KAUSCH, A. P. et al. Edit at will: Genotype independent plant transformation in the era of advanced genomics and genome editing. **Plant Science**, v. 281, p. 186–205, 1 abr. 2019.

KHVATKOV, P. et al. Callus induction and regeneration in *Wolffia arrhiza* (L.) Horkel ex Wimm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 120, n. 1, p. 263–273, 2015a.

KHVATKOV, P. et al. Transformation of *Wolffia arrhiza* (L.) Horkel ex Wimm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 123, n. 2, p. 299–307, 2015b.

KO, S. M. et al. Expression of the protective antigen for PEDV in transgenic duckweed, *Lemna minor*. **Horticulture Environment and Biotechnology**, v. 52, n. 5, p. 511–515, 2011.

KRUSE, C. et al. Transient transformation of *Wolffia columbiana* by particle bombardment. **Aquatic Botany**, v. 72, n. 2, p. 175–181, 2002.

LAM, E. et al. Duckweed in bloom: The 2nd International Conference on Duckweed Research and Applications heralds the return of a plant model for plant biology. **Plant Molecular Biology**, v. 84, n. 6, p. 737–742, 2014.

LONGLAND, J. M.; FRY, S. C.; TREWAVAS, A. J. Developmental Control of Apiogalacturonan Biosynthesis and UDP-Apiose Production in a Duckweed. **Plant physiology**, v. 90, n. 3, p. 972–976, jul. 1989.

MAMTA, B.; RAJAM, M. V. **RNAi technology: a new platform for crop pest control** **Physiology and Molecular Biology of Plants** Springer India, , 1 jul. 2017.

MATOH, T.; KAWAGUCHI, S.; KOBAYASHI, M. Ubiquity of a Borate-Rhamnogalacturonan II Complex in the Cell Walls of Higher Plants. **Plant and Cell Physiology**, v. 37, n. 5, p. 636–640, 1996.

MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 3, p. 266–277, jun. 2008.

NAUMANN, B.; EBERIUS, M.; APPENROTH, K. J. Growth rate based dose-response relationships and EC-values of ten heavy metals using the duckweed growth inhibition test (ISO 20079) with *Lemna minor* L. clone St. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, n. 12, p. 1656–1664, 2007.

O'NEILL, M. A et al. Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. **Annual review of plant biology**, v. 55, p. 109–139, 2004.

OLÁH, V.; HEPP, A.; MÉSZÁROS, I. Assessment of Giant Duckweed (*Spirodela polyrhiza* L. Schleiden) Turions as Model Objects in Ecotoxicological Applications. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 96,

n. 5, p. 596–601, 2016.

PAGLIUSO, D. et al. Correlation of apiose levels and growth rates in duckweeds. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, n. JUL, p. 1–10, 2018.

PAGLIUSO, D. et al. NDP-Sugar Pathways Overview of Spirodela polyrhiza and Their Relevance for Bioenergy and Biorefinery. **Bioenergy Research**, n. 0123456789, 2022.

PERRY, T.; APRIL, R. Publ22.Pdf. p. 1866–1869, 1968.

PERRY, T. O.; BYRNE, O. R. Turion Induction in Spirodela polyrhiza by Abscisic Acid. **Plant Physiology**, v. 44, n. 5, p. 784–785, 1969.

PETERSON, A. A. et al. Accumulation of recombinant fusion protein — secretory analog of Ag85B and ESAT6 Mycobacterium tuberculosis proteins — in transgenic Lemna minor L. plants. **Biotechnologia acta**, v. 8, n. 5, p. 38–48, 2015.

PIČMANOVÁ, M.; MØLLER, B. L. Apiose: One of nature's witty games. **Glycobiology**, v. 26, n. 5, p. 430–442, 2016.

POTENZA, C.; ALEMAN, L.; SENGUPTA-GOPALAN, C. **Invited review: Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: Promoters used in plant transformation** In **Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant** Springer, , jan. 2004.

REITER, W. D.; CHAPPLE, C. C. S.; SOMERVILLE, C. R. Altered growth and cell walls in a fucose-deficient mutant of Arabidopsis. **Science**, v. 261, n. 5124, p. 1032–1035, 20 ago. 1993.

RIVAL, S. et al. Spirodela (duckweed) as an alternative production system for pharmaceuticals: A case study, aprotinin. **Transgenic Research**, v. 17, n. 4, p. 503–513, 2008.

RODRIGUES, T. B.; FIGUEIRA, A. Management of Insect Pest by RNAi — A New Tool for Crop Protection. In: **RNA Interference**. [s.l.] InTech, 2016.

RUIJTER, J. M. et al. Amplification efficiency: Linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 6, 2009.

RYDEN, P. et al. Tensile properties of Arabidopsis cell walls depend on both a xyloglucan cross-linked microfibrillar network and rhamnogalacturonan II-borate complexes. **Plant physiology**, v. 132, n. 2, p. 1033–1040, 1 jun. 2003.

SAVINO, S. et al. Deciphering the enzymatic mechanism of sugar ring contraction in UDP-apiose biosynthesis. **Nature Catalysis**, v. 2, n. 12, p. 1115–1123, 1 dez. 2019.

SMART, C.; TREWAVAS, A. Abscisic-acid-induced turion formation in Spirodela polyrhiza LI Production and development of the turion. **Plant, Cell & Environment**, v. 3, p. 507–514, 1983.

SOWINSKI, E. E. et al. Linkage structure of cell-wall polysaccharides from three duckweed species. **Carbohydrate Polymers**, v. 223, n. July, p. 115119, 2019.

STITT, M.; ZEEMAN, S. C. Starch turnover: Pathways, regulation and role in

- growth. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 15, n. 3, p. 282–292, 2012.
- STOMP, A.-M. M. The duckweeds: a valuable plant for biomanufacturing. **Biotechnology annual review**, v. 11, n. SUPPL., p. 69–99, 28 jan. 2005.
- STOMP, A.; RAJBHANDARI, N. **Duckweed genetically engineered**, 2000.
- SUN, Y. et al. Expression and characterization of *Acidothamus cellulolyticus* E1 endoglucanase in transgenic duckweed *Lemna minor* 8627. **Bioresource technology**, v. 98, n. 15, p. 2866–2872, 2007.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673, 11 nov. 1994.
- THU, P. T. L. et al. Regeneration and Transformation of Gene Encoding the Hemagglutinin Antigen of the H5N1 Virus in Frond of Duckweed (*Spirodela polyrhiza* L.). **Journal of Agricultural Studies**, v. 3, n. 1, p. 48, 2015.
- TIMMERMANS, M. C. P. et al. The pFF plasmids: cassettes utilising CaMV sequences for expression of foreign genes in plants. **Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 3–4, p. 333–344, 1 jun. 1990.
- VAIN, P.; MCMULLEN, M. D.; FINER, J. J. Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. **Plant cell reports**, v. 12, n. 2, p. 84–88, jan. 1993.
- VANDESOMPELE, J. et al. **Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://genomebiology.com/2002/3/7/research/0034.1>> Correspondence: rankSpe leman.>. Acesso em: 15 abr. 2020.
- VUNSH, R. et al. High expression of transgene protein in *Spirodela*. **Plant Cell Reports**, v. 26, n. 9, p. 1511–1519, 2007.
- WANG, W.; WU, Y.; MESSING, J. RNA-Seq transcriptome analysis of *Spirodela* dormancy without reproduction. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 60, jan. 2014.
- YAMAMOTO, Y. T. et al. Genetic Transformation of Duckweed *Lemna gibba* and *Lemna minor* Published by: Society for In Vitro Biology Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/4293473> . Your use of the JSTOR archive indicates your acceptance of JSTOR ' s Terms and Conditions of Use. **In Vitro**, v. 37, n. 3, p. 349–353, 2001.
- YANG, G. L. et al. Frond transformation system mediated by *Agrobacterium tumefaciens* for *Lemna minor*. **Plant Molecular Biology**, v. 98, n. 4–5, p. 319–331, 2018.
- YANG, G. L. et al. Research progress of a potential bioreactor: Duckweed. **Biomolecules**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2021.
- YANG, J. et al. Transformation development in duckweeds. In: KOLE, C. et al. (Eds.). **The Duckweed Genomics**. Gewerbestrasse: Springer Nature

Switzerland, 2019. p. 143–156.

YANG, J. et al. Transformation Development in Duckweeds. In: [s.l: s.n.]. p. 143–155.

YOUNIS, A. et al. RNA interference (RNAi) induced gene silencing: A promising approach of hi-tech plant breeding. **International Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 10, p. 1150–1158, 2014.

YU, C. et al. Integrated analysis of transcriptome and metabolites reveals an essential role of metabolic flux in starch accumulation under nitrogen starvation in duckweed. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 167, 26 dez. 2017.

YU, N. et al. **Delivery of dsRNA for RNAi in insects: An overview and future directions****Insect Science**, fev. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23955821>>. Acesso em: 10 abr. 2020

ZHAO, X. et al. UDP-Api/UDP-Xyl synthases affect plant development by controlling the content of UDP-Api to regulate the RG-II-borate complex. **The Plant Journal**, p. 1–16, 2020.

ZIEGLER, P. et al. Relative in vitro growth rates of duckweeds (Lemnaceae) - the most rapidly growing higher plants. **Plant biology (Stuttgart, Germany)**, v. 17, n. Fao 2013, p. 1–9, 2014.

CÁPITULO V

**EFEITO DO BORO NO DESENVOLVIMENTO E NA PAREDE
CELULAR DE *S. polyrhiza***

Colaboradores: Dr. João Cristiano Ulrich e João Pedro de Jesus Pereira

5.1. INTRODUÇÃO

As lentilhas-d'água são as menores plantas aquáticas com capacidade de florir contemplando 37 espécies divididas em cinco gêneros: *Spirodela*, *Landoltia*, *Lemna*, *Wolffiella* e *Wolffia* (APPENROTH; BORISJUK; LAM, 2013; LANDOLT, 1992; LES et al., 2002). A capacidade de crescimento acelerado e alto desempenho para absorver metais essenciais e metalóides da água tornam essas plantas um interessante objeto de estudo, especialmente para compreender a alocação e assimilação dos metais na estrutura da planta (DAVIS; DRAKE; MAIER, 2002; ORON, 1994; ORON; PORATH; JANSEN, 1987; ZIEGLER et al., 2014). O crescimento das lentilhas d'água é 30 vezes mais rápido do que qualquer outra cultivar agrícola (LAM et al., 2014) e está hipoteticamente relacionado à capacidade da planta de capturar boro, que é um micronutriente essencial para o desenvolvimento.

A lentilha-d'água é considerada uma excelente acumuladora de boro (780 mg B por Kg de parede celular) (FRICK, 1985; GLANDON; MCNABB, 1978; MATOH, 1997), onde é fixada em cis-dímeros de polissacarídeos não específicos, carboidratos e/ou glicoproteínas da parede celular (BLEVINS; LUKASZEWSKI, 1998; LOOMIS; DURST, 1992; MATSUNAGA et al., 2004). As paredes celulares das plantas são uma estrutura complexa de polissacarídeos, proteínas e compostos fenólicos organizados em uma microfibrila de celulose ligada à hemiceluloses e lignina, os quais estão imersos em uma matriz péctica (CARPITA; GIBEAUT, 1993). A composição da parede é diversa entre espécies e tecidos e no caso das lentilhas d'água, apresenta elevados teores de pectina ricas em xilose e apiose e esses polissacarídeos pécticos incluindo os ácidos urônicos são excelentes candidatos para fixação de boro (AVCI; PEÑA; O'NEILL, 2017; DE SOUZA et al., 2013; MATOH, 1997; PAGLIUSO et al., 2018, 2020; SOWINSKI et al., 2019). Neste contexto, as pectinas (em especial apiogalacturonanos e xilogalacturonanos) podem estar relacionadas à capacidade de armazenar nos tecidos o baixo conteúdo de boro disponível na água permitindo seu desenvolvimento e crescimento acelerado.

A disponibilidade de boro pode afetar várias vias metabólicas levando a alterações nas características fisiológicas e morfológicas, as quais estão principalmente relacionados à composição da parede, tamanho da célula,

porosidade e força de tensão (BLEVINS; LUKASZEWSKI, 1998; CAMACHO-CRISTÓBAL; REXACH; GONZÁLEZ-FONTES, 2008; MATOH, 1997). O estudo realizado por Hu et al. (1996) verificou que o requerimento de boro está relacionado ao teor de pectinas, correlacionando-se positivamente com o ácido urônico, e os açúcares ramnose e galactose. Portanto, sabendo que a parede celular de lentilhas pode ser facilmente modificada (PAGLIUSO et al., 2018), e sua forte correlação com a disponibilidade de boro (ZHAO et al., 2020), foi avaliado se a suplementação de um meio de cultura com diferentes concentrações de ácido bórico alteraria o desenvolvimento e a composição dos carboidratos estruturais em *Spirodela polyrhiza*.

5.2. OBJETIVOS

Avaliar o efeito no boro no desenvolvimento e nos carboidratos estruturais e não estruturais de *S. polyrhiza* e seus efeitos sob a capacidade de sacarificação de plantas cultivadas em diferentes concentrações de ácido bórico.

5.3. MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1. Material vegetal

Spirodela polyrhiza 9509 foram cultivadas sob condições axênicas em meio ½ Schenk-Hildebrandt (SH (300 mg.L⁻¹ (NH₄)₃PO₄; 151 mg.L⁻¹ CaCl₂; 0.1 mg.L⁻¹ CoCl₂.6H₂O; 0.2 mg.L⁻¹ Cu.SO₄.5H₂O; 20 mg.L⁻¹ Na₂-EDTA; 15 mg.L⁻¹ FeSO₄.7H₂O; 195.4 mg.L⁻¹ MgSO₄; 10 mg.L⁻¹ MnSO₄.H₂O; 0.1 mg.L⁻¹ H₂MoO₃.2H₂O; 1 mg.L⁻¹ KI; 2500 mg.L⁻¹ KNO₃; e 1 mg.L⁻¹ ZnSO₄.7H₂O (pH 6,5) suplementado com 0,5% de sacarose. Para avaliar o efeito do boro sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas, as plantas foram cultivadas em meio convencional (½ SH) e adicionados ácido bórico (17,49% boro – PM 61,83 g.mol⁻¹; 99,5%) nas concentrações de 0; 2,5; 5; 10; 20; 40; 80; 160 e 320 mg.L⁻¹. As plantas foram cultivadas por 7 e 10 dias a 25 °C com fotoperíodo de 16 h de luz com intensidade luminosa de 100 μmols.m⁻².s⁻¹. As biomassas foram recuperadas, pesadas, congeladas em nitrogênio líquido e moídas em almofariz e pilão. As amostras destinadas à biologia molecular foram armazenadas a -80 °C e as amostras para análise bioquímica foram liofilizadas.

5.3.2. Quantificação de boro

O boro remanescente nos meios de cultura após 7 e 10 dias de cultivo, bem como o teor de boro em *S. polyrhiza* foram quantificados para a avaliação do conteúdo remanescente e absorvido pelas plantas. Durante as coletas, 5 mL do meio de cultivo foram recuperados e congelados a -20 °C. Cinquenta mg da biomassa seca e pulverizada de cada amostra foi submetida à digestão com ácido nítrico conforme descrito por Liu et al., (2018). Em cada amostra foram adicionados 5 mL de ácido nítrico 65% e 1 mL de peróxido de hidrogênio 30% e aquecidas a 90 °C por 4 horas. A reação final foi diluída para assumir 8% de ácido nítrico, filtrada a 0,22 µM e armazenada a -20 °C. As concentrações de boro do meio e das soluções digeridas foram determinadas por espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES, Spectro ARCOS, AMETEK, EUA). A quantificação foi realizada com uma curva padrão de boro (0.1 to 5.0 µg.g⁻¹).

5.3.3. Taxa de crescimento relativo

A taxa de crescimento relativo (TCR) foi calculada de acordo com o *International Steering Committee on Duckweed Research and Applications* (ISCDRA). As medidas de crescimento seguiram o procedimento descrito por Ziegler et al. (2014). Vinte e cinco frondes de *S. polyrhiza* foram inoculados no meio de cultura. Ao mesmo tempo, para T₀ (o ponto inicial de análise) foram coletadas cinco réplicas para medições de massa úmida, enquanto que T₇ foi coletado após 7 dias de crescimento e T₁₀ após 10 dias. A TCR foi calculada pela equação I, simplificada nas equações II e III, onde x representa os dados dos parâmetros avaliados e t representa o tempo decorrido (zero -t₀, 7 dias-t₇ e 10 dias-t₁₀).

$$X_t = x_{t_0} * e^{RGR*t} \text{ (I)}$$

$$TCR = \frac{\ln x_{t_7} - \ln x_{t_0}}{t_7 - t_0} \text{ (II)}$$

$$TCR = \frac{\ln x_{t_{10}} - \ln x_{t_0}}{t_{10} - t_7} \text{ (III)}$$

5.3.4. Extração e análise de açúcares solúveis

Para verificar se o conteúdo de glicose, sacarose, frutose e rafinose foi alterado em resposta ao incremento de ácido bórico, os açúcares solúveis totais

foram extraídos três vezes de 10 mg de biomassa seca pulverizada com 1,5 mL de etanol 80% (v/v) a 80 °C por 20 minutos cada. Os sobrenadantes contendo os açúcares foram recuperados por centrifugação a 14.000 rpm por 10 min., concentrado a vácuo (Savant SC 250 EXP - Thermo Scientific®), e ressuspensos em 1 mL de água deionizada e 1 mL de clorofórmio. Os açúcares solúveis obtidos foram analisados por cromatografia de troca aniônica de alto eficiência com detecção por pulso amperométrico (HPAEC-PAD) em sistema Dionex® (ICS 5000) usando uma coluna CarboPac PA1 e eluída com hidróxido de sódio 150 µM em uma corrida isocrática de 27 min. A quantificação foi realizada através de uma curva padrão. O resíduo insolúvel em álcool (AIR) foi seco à 45 °C para quantificar amido.

5.3.5. Extração e quantificação de amido

O teor de amido foi determinado em AIR conforme descrito por Amaral et al., (2007). O AIR foi tratado com 120 U.mL⁻¹ de α-amilase (E.C. 3.2.1.1) de *Bacillus licheniformis* (Megazyme®) em tampão MOPS 10 mM pH 6,5 a 75 °C por 1 h. A reação seguiu pela adição de 30 U.mL⁻¹ de amiloglicosidase (E.C. 3.2.1.3) de *Aspergillus niger* (Megazyme®) em acetato de sódio 100 mM pH 4,5 a 50 °C por mais 1 h. Os sobrenadantes contendo amido foram recuperados por centrifugação e a determinação foi realizada com mistura contendo glicose oxidase (1.100 U.mL⁻¹), peroxidase (700 U.mL⁻¹), 4-aminoantipirina (290 µmol.L⁻¹) e 50 mM de fenol em pH 7,5. As reações foram incubadas por 15 min à 30 °C e a absorbância foi medida a 490 nm. A curva de calibração foi realizada com glicose comercial (Sigma-Aldrich®) de 0,02–0,2 mg.mL⁻¹.

5.3.6. Hidrólise e análise de monossacarídeos de parede celular

Após remoção do amido, dois mg foram hidrolisados com 1 mL de ácido trifluoroacético 2 M por 1 h a 100 °C. Em seguida, as amostras foram secas em condensador a vácuo, ressuspensas em 1 mL de água ultrapura e filtradas em filtros de 0,22 µm (Millipore®). Para quantificar a celulose, as amostras foram solubilizadas em 100 µL de ácido sulfúrico 72% e aquecidas à 45 °C por 30 min, diluídas para 4%, incubadas a 100 °C por 1,5 h e filtradas em 0,22 µm (Millipore®). Os açúcares apiose, arabinose, fucose, galactose, glicose, manose, ramnose e xilose foram analisados por HPAEC-PAD em uma coluna CarboPac

SA10 (sistema ICS 5.000, Dionex-Thermo Scientific®). A coluna foi eluída com 99,2% de água e hidróxido de sódio 0,8% (v/v) ($1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) e os açúcares foram detectados usando uma base pós-coluna contendo NaOH 500 mM ($0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$).

5.3.7. Determinação do conteúdo de ácidos urônicos

O teor de ácido urônico total está relacionado ao teor de pectinas, e sua determinação seguiu o descrito por Filisetti-Cozzi e Carpita (1991). Cinco mg da parede (AIR sem amido) foram hidrolisados em 2 mL de ácido sulfúrico concentrado, seguido da adição de 1 mL de água miliQ. Cada reação foi incubada em gelo sob agitação (1.250 rpm) por 10 min. As reações finais foram diluídas para 10 mL e desses 400 μL da hidrólise foram adicionados 40 μL de ácido sulfâmico 4M em solução de sulfamato de potássio (pH 1,6), 2,4 mL de borato de sódio 75 mM em ácido sulfúrico e incubados à $100 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 min. As reações foram resfriadas em gelo por 10 min, e 80 μL de m-hidroxifenil em 0,5% NaOH foram adicionados e agitados em vórtex para desenvolvimento de cor. As reações finais foram quantificadas à 525 nm, com uma curva padrão de 0,12-2,5 M de ácido D-galacturônico.

5.3.8. Extração de RNA, tratamento com DNase e síntese de cDNA

O mRNA foi extraído com o kit ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System (Promega®) e seguiu o tratamento com DNase conforme as instruções do fabricante. A quantificação e a pureza do mRNA foram asseguradas usando um espectrofotômetro Nanodrop ND-100 (Thermo Scientific®), e amostras com razões 260/280 entre 1,8 e 2,2 foram consideradas como suficientemente puras. A integridade das amostras também foi assegurada por eletroforese em gel de agarose a 1% e corada com *SYBR Safe DNA gel stain* (Thermo Scientific®). Aproximadamente 1 μg de cada amostra de RNA foi transcrita reversamente com hexâmeros randômicos pela *Transcriptase Reverse SuperScript III* (Thermo Scientific®). Os cDNA adquiridos foram testados quanto à ausência de DNA genômico com os oligonucleotídeos de UPD-apiose/UDP-xilose sintase (AXS) (Forward: 5'- GCATCCAGTTCCACCGTCTC -3'; Reverse: 5'- GCAGGGCGTTTCATCTTCTTT -3').

5.3.9. Análise de expressão relativa por qRT-PCR

A abundância relativa de transcritos alvo em *S. polyrhiza* 9509 foi medida por análise qRT-PCR usando um sistema QuantiStudio 6 Flex Real-Time PCR (Applied Biosystems®). As reações de PCR foram realizadas com 1,4 µL de cDNA (1:10), 7 µL 2X SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems®), e as seguintes condições de ciclagem: 95 °C por 10 min, 40 ciclos de 95 °C por 15 s, 60 °C por 30 s e 72 °C por 30 s. Os valores de Cq e a eficiência de cada oligonucleotídeos foram determinados usando o software LinRegPCR (RUIJTER et al., 2009). A abundância relativa de *UDP-apiose/UDP-xilose sintase (AXS)*, *UDP-glucuronato descarboxilase (UXS)*, *enzima de biossíntese de ramnose (RHM)*, *manose-6-fosfato-isomerase*, *α-galacturonosiltransferase (GAUT)*, *sacarose sintase (Susy)*, e *amido sintase (SS)* (**Apêndice 5.1**) foram quantificadas em comparação com a expressão média, normalizada pelo maior valor de Cq, e os valores de Cq dos alvos mencionados foram normalizados pela média geométrica da combinação de genes de referência (*fator de alongamento 1-α (EF1)* e *proteína da família F-box (FBOX)*). Os transcritos específicos foram selecionados com base nos níveis de expressão significativos apresentados em Pagliuso et al. (2022).

5.3.10. Análise de dados

Cinco repetições foram utilizadas para o crescimento relativo, acúmulo de biomassa, dosagem de boro em meio, avaliação de pH, açúcares solúveis, amido, ácidos urônicos, quantificação de monossacarídeos e RT-qPCR. Três repetições foram usadas para dosagem de boro do tecido. Os dados de cada tempo avaliado (7 e 10 dias) foram analisados por ANOVA one-way seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$). A comparação entre 7 e 10 dias foi realizada com o teste t-Student para cada concentração em um intervalo de confiança de 95%. As análises foram conduzidas com o software R versão 3.6.1.

A correlação de Pearson foi realizada entre o teor de boro na biomassa e a taxa crescimento relativo (TCR) para 7 e 10 dias ($n=27$). Foi realizado a correlação entre a TCR e pH aos 7 e 10 dias ($n=45$) e TCR e ácidos urônicos aos 10 dias. Os ácidos urônicos foram determinados apenas aos 10 dias, e a última concentração de boro (320 mg.L^{-1}) foi excluída da análise ($n= 40$).

A relação pentose:hexose foi determinada nos monossacarídeos da parede celular pela soma das pentoses (apiose, arabinose e xilose) dividida pela soma das hexoses (glicose, galactose, ramnose, fucose e manose).

5.4. RESULTADOS

5.4.1. O boro aumenta o crescimento de *Spirodela polyrhiza*, mas causa toxicidade em concentrações elevadas

S. polyrhiza cultivada por 10 dias em diferentes concentrações de ácido bórico (0; 2,5; 5; 10; 20; 40; 80; 160 e 320 mg.L⁻¹), teve seu desenvolvimento comprometido, apresentando redução no crescimento, clorose e pigmentação mais escura (**Figura 5.1**). As plantas cultivadas em 2,5 mg.L⁻¹ (controle) apresentaram a maior taxa de crescimento e acúmulo de biomassa aos 7 dias (**Figuras 5.2B e 5.3A**). Por outro lado, em 10 dias, o maior crescimento e acúmulo de biomassa foi alcançado em 10 mg.L⁻¹ e mantido até a concentração de 80 mg.L⁻¹ (**Figura 5.3**). O ponto tóxico foi alcançado entre 80-160 mg.L⁻¹ de ácido bórico, morfologicamente nessas concentrações as frondes filhas permaneceram unidas ao corpo da fronde mãe causando superintegração (**Figuras 5.1P, 5.1AH**) da colônia, não abscisão dos estipes (**Figura 2F e H**) e uma sobreposição das frondes 'filhas' e 'netas' (**Figura 2E e G**) que não puderam ser recuperados em concentrações acima de 160 mg.L⁻¹ (**Apêndice 5.2**).

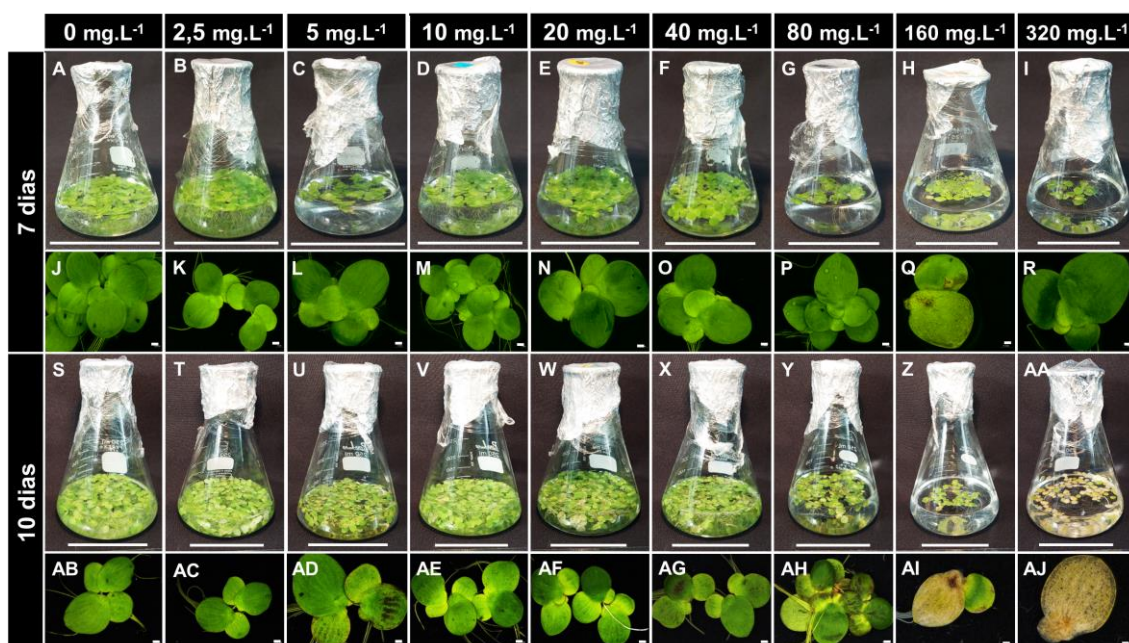


Figura 5.1. Avaliação da toxicidade do boro em *Spirodela polyrhiza*. *S. polyrhiza* foi cultivada em nove concentrações diferentes de ácido bórico (0 mg.L⁻¹; 2,5 mg.L⁻¹; 5 mg.L⁻¹; 10 mg.L⁻¹; 20 mg.L⁻¹; 40 mg.L⁻¹; 80 mg.L⁻¹; 160 mg.L⁻¹; 320 mg.L⁻¹) com duas coletas. As Figuras A-R mostram

plantas cultivadas por 7 dias e S-AJ cultivadas por 10 dias. O primeiro e terceiro conjunto de figuras (A-I e S-AA) mostra o cultivo em frascos enquanto o segundo conjunto (J-R e AB-AJ) mostra alterações morfológica da toxicidade do boro nas frondes. As barras grandes representam 5 cm e as barras pequenas representam 1 cm.

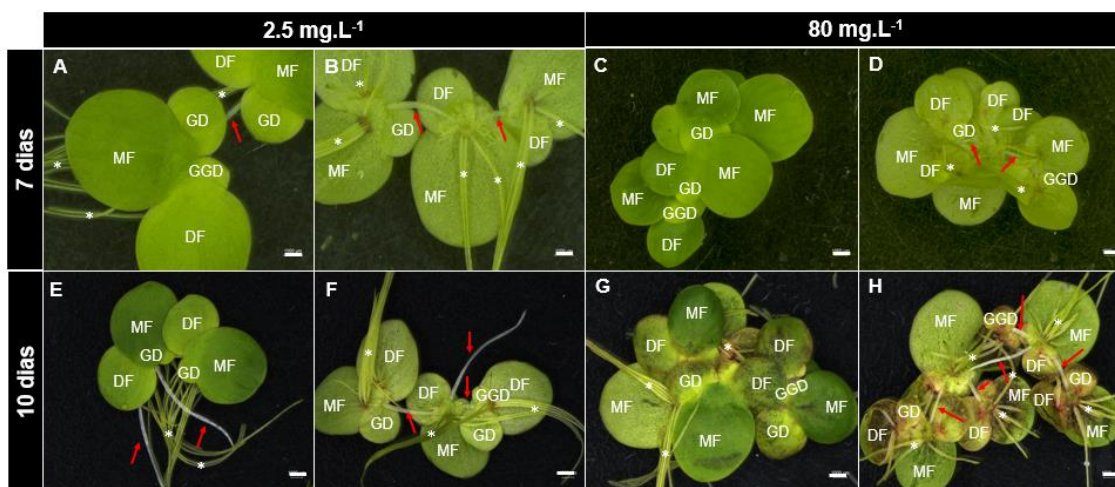


Figura 5.2. *Spirodela polyrhiza* sob toxicidade de boro. As Figuras A, B, C e D representam plantas cultivadas em 2,5 mg.L⁻¹ de boro e E, F, G e H cultivadas em 80 mg.L⁻¹ de boro. As Figuras A, B, E e F foram plantas coletadas aos 7 dias e C, D, G e H após 10 dias de exposição ao boro. As Figuras A, C, E e G mostram a visão abaxial das frondes de *Spirodela polyrhiza*. As Figuras B, D, F e H mostram as frondes das plantas em vista adaxial. O crescimento clonal de *Spirodela polyrhiza* envolve o desenvolvimento de novas frondes a partir de dois bolsões laterais, onde as novas frondes são conectadas por estipes (seta vermelha) que irão alongar e liberar a nova planta após o desenvolvimento. *Spirodela polyrhiza* pode ter várias raízes as quais estão apresentadas por um (*). Abreviaturas das figuras: MF = fronde mãe, DF = fronde filha, GF = fronde neta, GGF = fronde bisneta. A barra indica 0,1 cm.

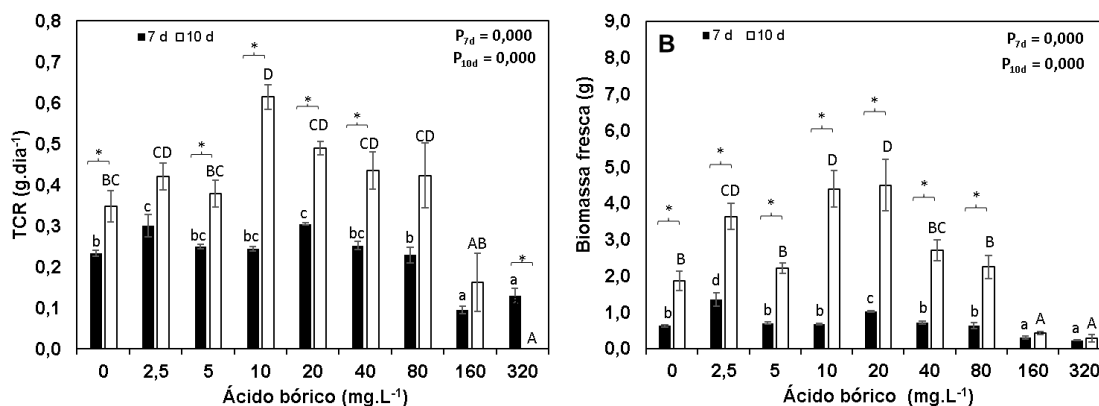


Figura 5.3. Crescimento relativo e acúmulo de biomassa de *Spirodela polyrhiza* cultivada em diferentes concentrações de boro. A Figura A mostra a taxa de crescimento relativo (TCR) da planta em 7 e 10 dias. A Figura B mostra o acúmulo de biomassa de *S. polyrhiza* em 7 e 10 dias. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão. Cada tempo avaliado (7 e 10 dias) foi submetido ao teste ANOVA-one way seguido do teste de Tukey ($p < 0,05$) em que letras minúsculas distintas em cima dos marcadores são estatisticamente diferentes em 7 dias e letras maiúsculas em cima dos marcadores são estatisticamente diferentes em 10 dias. Os asteriscos representam a diferença entre a comparação de 7 e 10 dias realizado pelo teste T de student ($p < 0,05$) em cada concentração avaliada ($n=5$).

5.4.2. Assimilação de boro estimula o crescimento das plantas

A concentração de ácido bórico em solução é dependente do pH, no início do experimento todos os tratamentos foram ajustados com NaOH 1 M para pH 6,5, em que o ácido bórico está presente em sua forma não dissociada, mas, aos 7 e 10 dias, houve uma flutuação em relação ao pH inicial. Além disso, observou-se que o pH se correlacionou positivamente com a TCR quando superior a 7,0, ponto de equilíbrio em que a porcentagem de ácido bórico começa a diminuir, com maior crescimento das plantas (**Apêndice 5.3.**). O teor de boro foi avaliado no meio e no material vegetal. A redução do boro no meio foi identificada gradativamente até o aumento das concentrações iniciais de ácido bórico, bem como pelo tempo de crescimento das plantas (**Figura 5.4A**) que também mostrou uma correlação significativa entre teor de boro e TCR (**Figuras 5.4C e 5.4D**). Além disso, a absorção de ácido bórico foi de 79% e 76% aos 7 e 10 dias respectivamente (**Figura 5.4A**). Enquanto que o teor de boro na biomassa de *S. polyrhiza* teve uma pequena alteração entre 7 (0,08-0,52 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) e 10 dias (0,08-1,69 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) com tendência de aumento em 10 dias (**Figura 5.4B**).

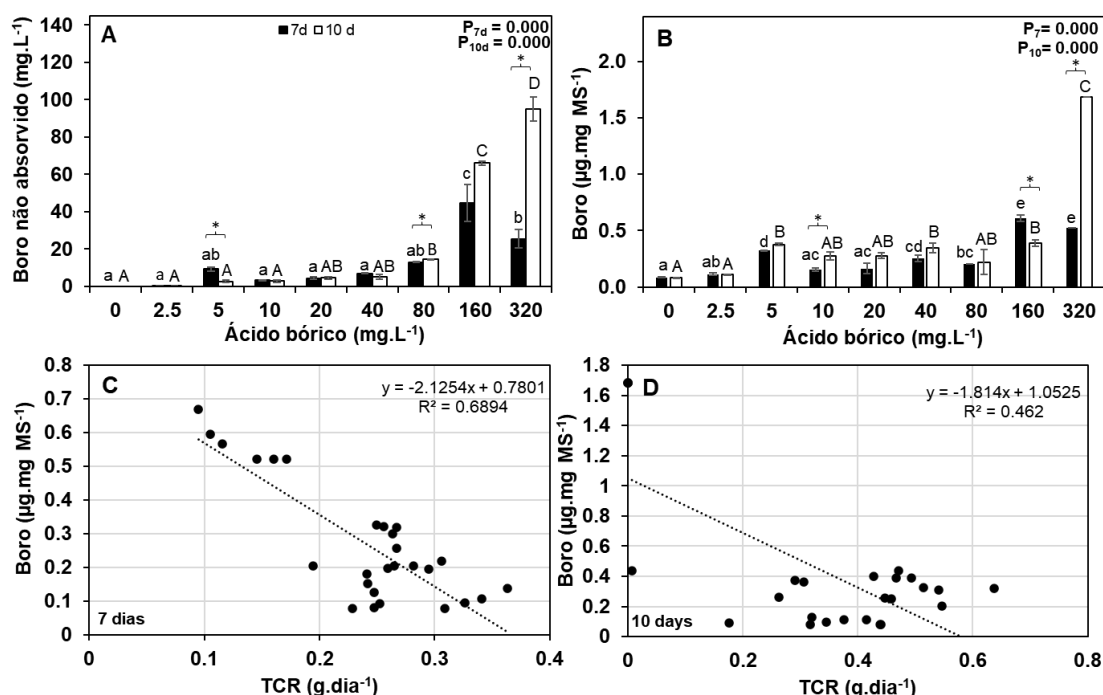


Figura 5.4. Níveis de boro em meio e em *S. polyrhiza* que foi cultivado por 7 e 10 dias em diferentes suplementações de ácido bórico. Figura A mostra o teor de boro remanescente no meio após o crescimento da planta, enquanto a Figura B mostra a absorção do teor de boro por *S. polyrhiza* em seus tecidos. As Figuras C e D mostram a correlação de Pearson do boro na biomassa vegetal e a TCR aos 7 e 10 dias, respectivamente ($n=27$). Os dados são apresentados como média \pm erro padrão. As barras escuras representam 7 dias de cultivo e as barras claras 10 dias. As letras minúsculas (7 dias) e maiúsculas (10 dias) no topo das barras mostram ANOVA

one-way com teste de Tukey ($p < 0,05$) em diferentes concentrações de boro. Os asteriscos representam a diferença entre a comparação de 7 e 10 dias realizado pelo teste T de student ($p < 0,05$) em cada concentração avaliada ($n=5$ meios e $n=3$ para biomassa vegetal).

5.4.3. Carboidratos não estruturais em resposta ao aumento de boro

Os carboidratos não estruturais avaliados compreenderam em glicose, frutose, sacarose, rafinose e amido, que são os primeiros a responder ao estresse e/ou condições desfavoráveis durante o crescimento e desenvolvimento das plantas. Os níveis de glicose apresentaram resposta inversa entre 7 e 10 dias, tendo menores níveis aos 7 dias e maiores aos 10 dias (**Figura 5.5A**). Por outro lado, o teor de frutose foi maior aos 7 dias em todas as concentrações de boro testadas, enquanto aos 10 dias foi identificada uma redução de 17% (**Figura 5.5B**). A rafinose, um sensor de açúcar ao estresse, foi aumentada 3 vezes na concentração 320 mg.L⁻¹ (**Figura 5.5C**). Na primeira coleta (7 dias), a rafinose diminuiu até a concentração de 10 mg.L⁻¹, aumentou em 20 mg.L⁻¹ e ficou em concentrações ínfimas em 40 e 80 mg.L⁻¹ (**Figura 5.5C**). Na segunda coleta, os teores de rafinose foram maiores e apresentaram tendência de aumento em concentrações maiores de boro, exceto para 160 mg.L⁻¹ (**Figura 5.5C**). Já os níveis de sacarose foram mantidos aos 7 e 10 dias, com exceção de 10 mg.L⁻¹ e 160 mg.L⁻¹ (**Figura 5.5D**). Também foram avaliados os níveis de expressão relativa do gene responsável pela clivagem e a síntese da sacarose (*SpSusy*, ortólogo a Spipo1G0051200). Foi identificada uma distinção entre a expressão de *SpSusy*, que aos 10 dias aumenta até 3 vezes (**Figura 5.5F**). A *SpSusy* nas concentrações de 0; 2,5 e 5 mg.L⁻¹ aumentou em 380% aos 10 dias em comparação com 7 dias, enquanto que as concentrações de 10, 80 e 320 mg.L⁻¹ aumentaram 65%, 115 % e 25%. Por outro lado, nas concentrações de ácido bórico >80 mg.L⁻¹ os teores de *SpSusy* foram reduzidos (**Figura 5.5F**).

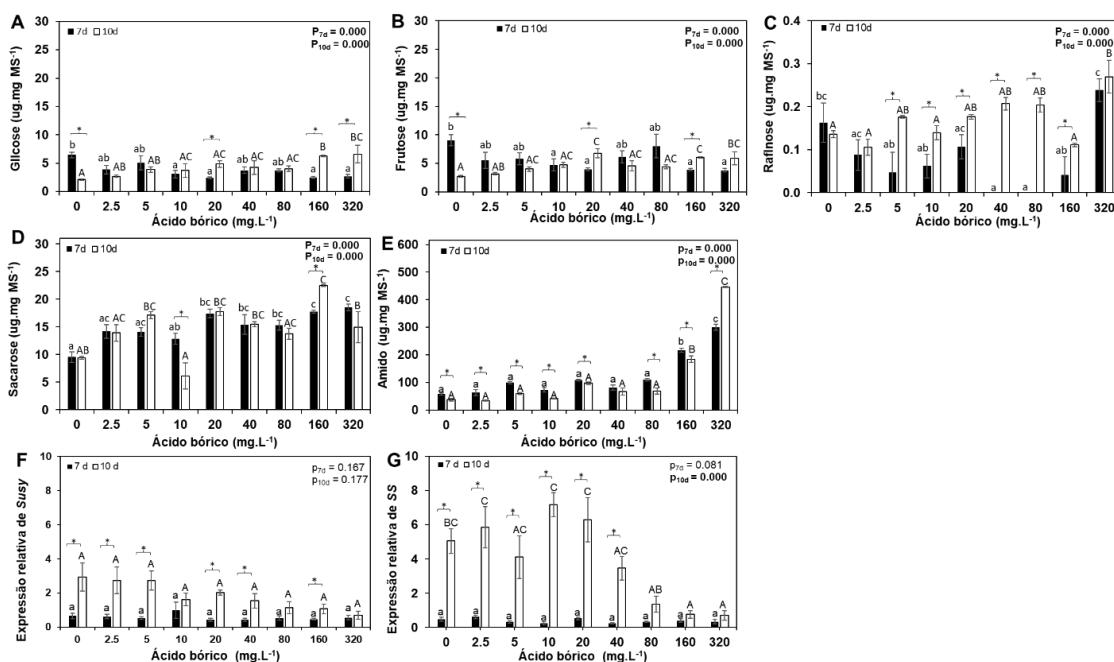


Figura 5.5. Mudanças de carboidratos não estruturais de *Spirodela polyrhiza* em elevados teores de ácido bórico. As Figuras A, B, C, D e E mostram os níveis de glicose, frutose, rafinose, sacarose e amido em $\mu\text{g.mg}^{-1}$ de massa seca. As Figuras F e G mostram os níveis de expressão relativa de sacarose sintase (*Susy*) e amido sintase (*SS*) por qRT-PCR. Os dados são apresentados pela média \pm erro padrão. As barras escuras representam os dados de 7 dias de cultivo em boro e as barras claras de 10 dias. Cada tempo avaliado foi submetido ao teste ANOVA-one way seguido do teste de Tukey ($p < 0,05$) em que letras minúsculas distintas são estatisticamente diferentes aos 7 dias e letras maiúsculas são estatisticamente diferentes aos 10 dias. Uma comparação entre 7 e 10 dias foi realizada com o teste t-Student para cada concentração e os asteriscos são significativos em 95% do intervalo de confiança ($n=5$).

O amido acumulou em concentrações elevadas de boro (**Figura 5.5E**). O transcrito de amido sintase (*SS* - *Spipo1G0057900*) foi avaliado para identificar o padrão de acúmulo de amido em *S. polyrhiza*. Aos 10 dias o nível de expressão relativa de *SpSS* aumentou até 20 mg.L^{-1} , reduziu pela metade em 40 mg.L^{-1} , seguido por uma redução considerável nos tratamentos subsequentes (**Figura 5.5G**). Comparando os níveis de *SpSS* aos 7 e 10 dias, é possível identificar um aumento de até 15 vezes aos 10 dias não corroborando com o acúmulo de amido identificado (**Figura 5E e 5G**).

5.4.4. Boro modula apiose e xilose na parede celular impactando na capacidade de sacarificação

S. polyrhiza possui uma parede celular rica em pectinas e sabendo que o boro está estritamente relacionado às modificações da pectina, esperava-se ver modificações na síntese deste polímero. Tomando como padrão a concentração 2,5 mg.L^{-1} com um conteúdo de ácidos urônicos de 84,3 $\mu\text{g.mg}^{-1}$ MS, as

concentrações de 5, 10, 20, 40 e 80 mg.L⁻¹ tiveram um aumento no teor de pectinas em 25,2% (105,6 µg.mg⁻¹ MS); 55,4% (131,1 µg.mg⁻¹ MS); 30,4% (110 µg.mg⁻¹ MS); 52,47% (128,6 µg.mg⁻¹ MS) e 23,4% (104,1 µg.mg⁻¹ MS) respectivamente (**Figura 5.6A**). Já a concentração de 160 mg.L⁻¹ de ácido bórico teve uma redução de 26,3% (62,17 µg.mg⁻¹ MS) (**Figura 5.6A**). A concentração de 320 mg.L⁻¹ não foi medida devido à falta de biomassa. Um dos genes relacionados ao esqueleto das pectinas para formar homogalacturonanos é a α-1,4-galacturonosiltransferase (*GAUT*). A expressão relativa do transcrito *GAUT* (ortólogo de Spipo12G0021200) foi aumentada 5 vezes para todos os tratamentos quando comparados aos 10 dias (**Figura 5.6B**). A baixa expressão do transcrito *GAUT* em 7 dias pode implicar um “estado transitório” de adaptação da elevação da exposição ao boro (**Figura 5.6B**). O conteúdo total de ácidos urônicos correlacionou positivamente taxa de crescimento relativo de *S. polyrhiza* ($R^2=0,46$) (**Figura 5.6C**).

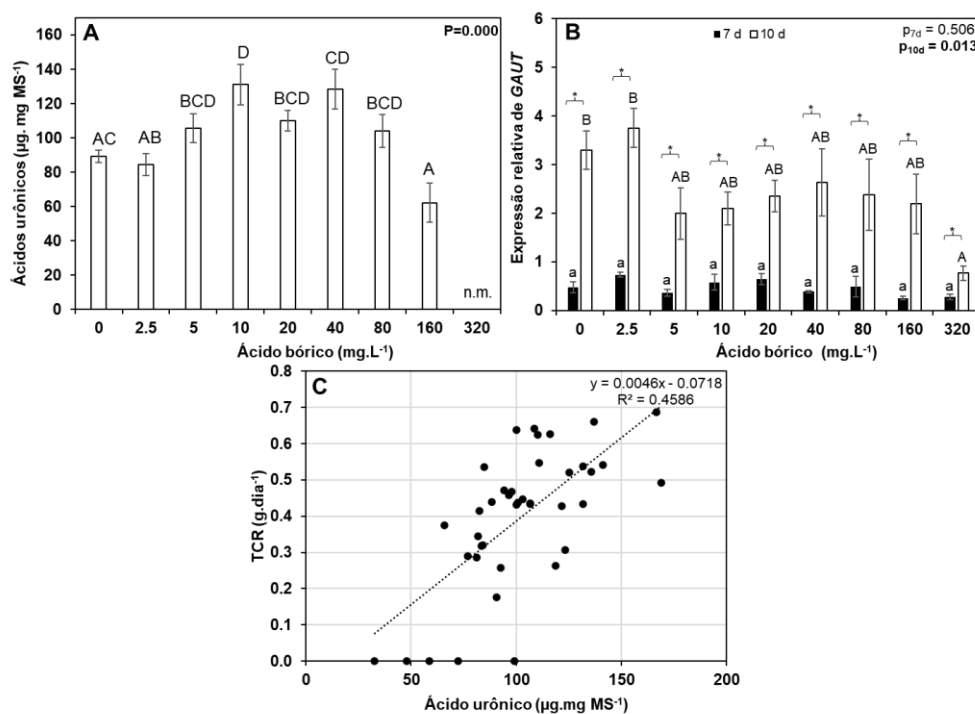


Figura 5.6. Conteúdo de pectina e suas implicações na transcrição e crescimento de *Spirodela polyrhiza*. A. Teor de ácido urônico no crescimento de 10 dias de *Spirodela polyrhiza* em diferentes concentrações de ácido bórico. B. Expressão relativa do transcrito *GAUT*, que é um genes responsável pela síntese de cadeias de ácidos galacturônicos em pectinas. C. Correlação entre o teor de pectina aos 10 dias e taxa de crescimento relativo em *Spirodela polyrhiza*. Os dados são apresentados como média ± erro padrão. As barras escuras representam dados de 7 dias e as barras claras de 10 dias. Cada tempo avaliado (7 e 10 dias) foi submetido ao teste ANOVA-one way seguido do teste de Tukey ($p < 0,05$) em que letras minúsculas distintas são estatisticamente diferentes em 7 dias e letras maiúsculas são estatisticamente diferentes em 10 dias. Comparações entre 7 e 10 dias foram realizadas com o

teste t de Student para cada concentração e os asteriscos são significativos em 95% do intervalo de confiança (n=5). n.m. não medido.

Os monossacarídeos ramnose e apiose são exclusivos de pectinas, a ramnose apresentou padrão crescente, sendo 12% maior aos 10 dias quando comparado ao controle ($2,5 \text{ mg.L}^{-1}$) (**Figura 5.7G**). A expressão relativa do gene relacionado à síntese de ramnose também foi quantificada (*SpRHM* - Spipo0G0113900) e aos 10 dias foi mais expressa (**Figura 5.7K**). A apiose é um açúcar ligante de boro encontrado em altos níveis em *S. polyrhiza*, o qual teve seu conteúdo reduzido em 30% (7 dias) e 17% (10 dias) sob boro elevado (**Figura 5.7E**). A expressão relativa de UDP-apiose/UDP-xilose sintase (*AXS* - Spipo0G0011100) foi maior em 7 dias em $2,5$ à 20 mg.L^{-1} de ácido bórico, e em 10 dias em 80 a 320 mg.L^{-1} (**Figura 5.7I**). Um padrão semelhante de redução foi observado para xilose em relação à concentração de ácido bórico mais alta (**Figura 5.7F**). A expressão gênica UDP-glucuronato descarboxilase (*UXS* - Spipo23G0021600) está relacionada à síntese de xilose e é mais expressa aos 10 dias (**Figura 5.7J**). Os monossacarídeos arabinose, galactose e glicose aumentaram em todas as concentrações de ácido bórico (**Figuras 5.7A, 5.7B e 5.7C**). A manose, foi reduzida aos 10 dias com um aumento concomitante na expressão da manose 6-fosfato isomerase (*MGP* - Spipo23G0012100) (**Figuras 5.7H e 5.7L**).

A alocação de carbono foi alterada nos monossacarídeos da parede celular como resposta ao ácido bórico disponível no meio durante o crescimento e desenvolvimento de *S. polyrhiza* (**Figura 5.7**). Para tanto, investigou-se a capacidade de sacarificação, a qual foi aumentada em 29% e 116% nas plantas cultivadas à 80 e 160 mg.L^{-1} (**Figura 5.8A**). O aumento da capacidade de sacarificação está relacionado a proporção de hexoses na biomassa (**Figura 5.8B**). O teor de glicose não celulósica aumentou com o tempo e em concentrações elevadas de boro (**Figura 5.7A**), o que não foi observado para a glicose celulósica (**Figura 5.8C**). A relação pentose:hexose foi reduzida nas maiores concentrações de ácido bórico disponíveis (**Figura 5.8B**). Curiosamente, as concentrações de $2,5$ e 10 mg.L^{-1} apresentam elevado acúmulo de biomassa e expressão de *SpAXS*, sugerindo uma relação entre a capacidade de crescimento de *S. polyrhiza* com *SpAXS* e conseqüentemente com o controle dos níveis de apiose na planta.

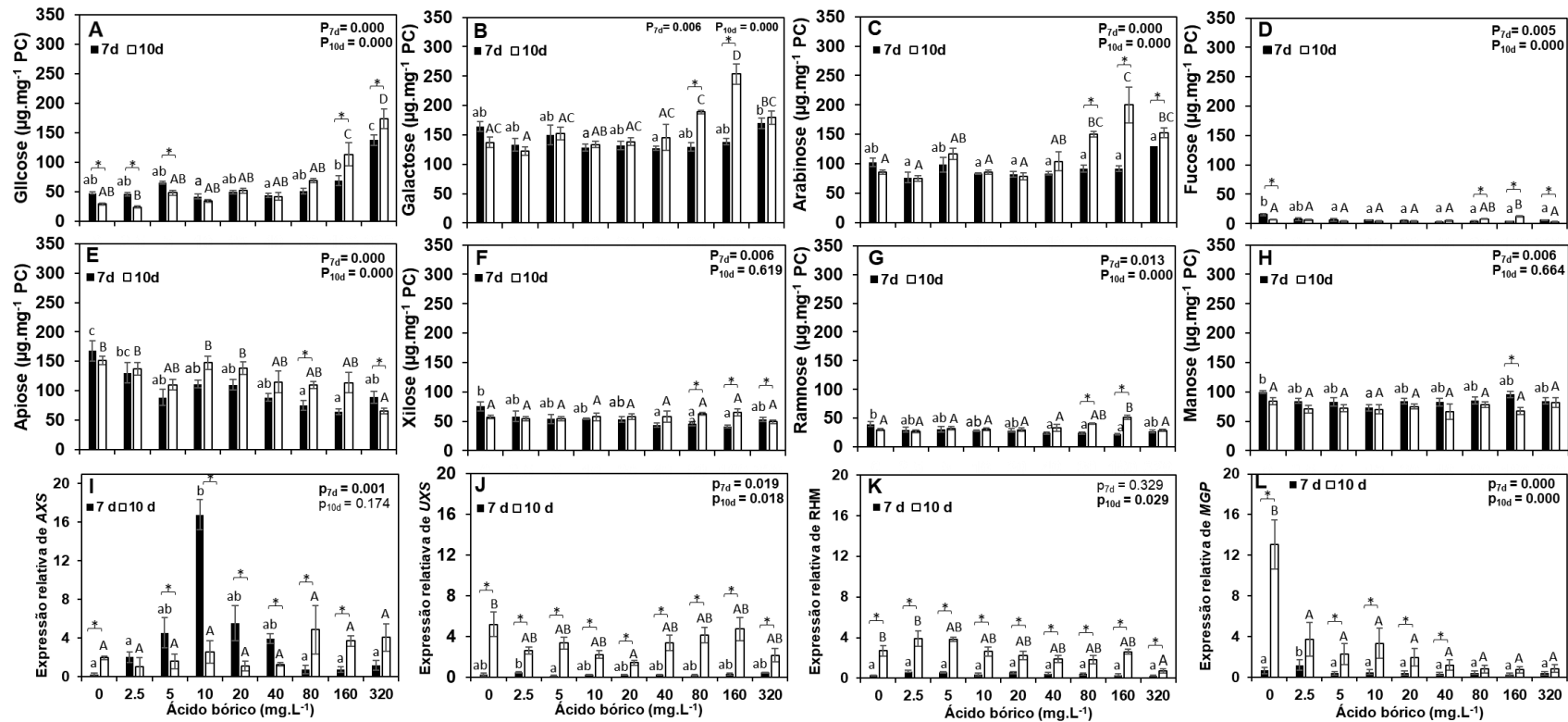


Figura 5.7. Monossacarídeos neutros de parede celular e expressão gênica de *Spirodela polyrhiza* cultivada em concentrações distintas de ácido bórico. A. Conteúdo de glicose. B. Conteúdo de galactose. C. Conteúdo de arabinose. D. Conteúdo de fucose. E. Conteúdo Apiose. F. Conteúdo de xilose. G. Conteúdo de ramnose. H. Conteúdo de manose. I. Expressão relativa de UDP-apiose/UDP-xilose sintase (AXS), um gene envolvido na síntese de apiose. J. Expressão relativa de UDP-glucuronato descarboxilase (UXS), um gene envolvido na síntese de xilose. K. Expressão relativa da biossíntese de ramnose (RHM). L. Expressão relativa de Manose-6-fosfato-isomerase (MGP), um gene envolvido na síntese de manose. Os dados são apresentados como média ± erro padrão. As barras escuras representam dados de 7 dias e as barras claras de 10 dias. Cada tempo avaliado (7 e 10) foi submetido ao teste ANOVA-one way seguido do teste de Tukey ($p < 0,05$) em que letras minúsculas distintas são estatisticamente diferentes em 7 dias e letras maiúsculas são estatisticamente diferentes em 10 dias. Comparações entre 7 e 10 dias foi realizada com o teste t-Student para cada concentração e os asteriscos são significativos em 95% do intervalo de confiança ($n=5$).

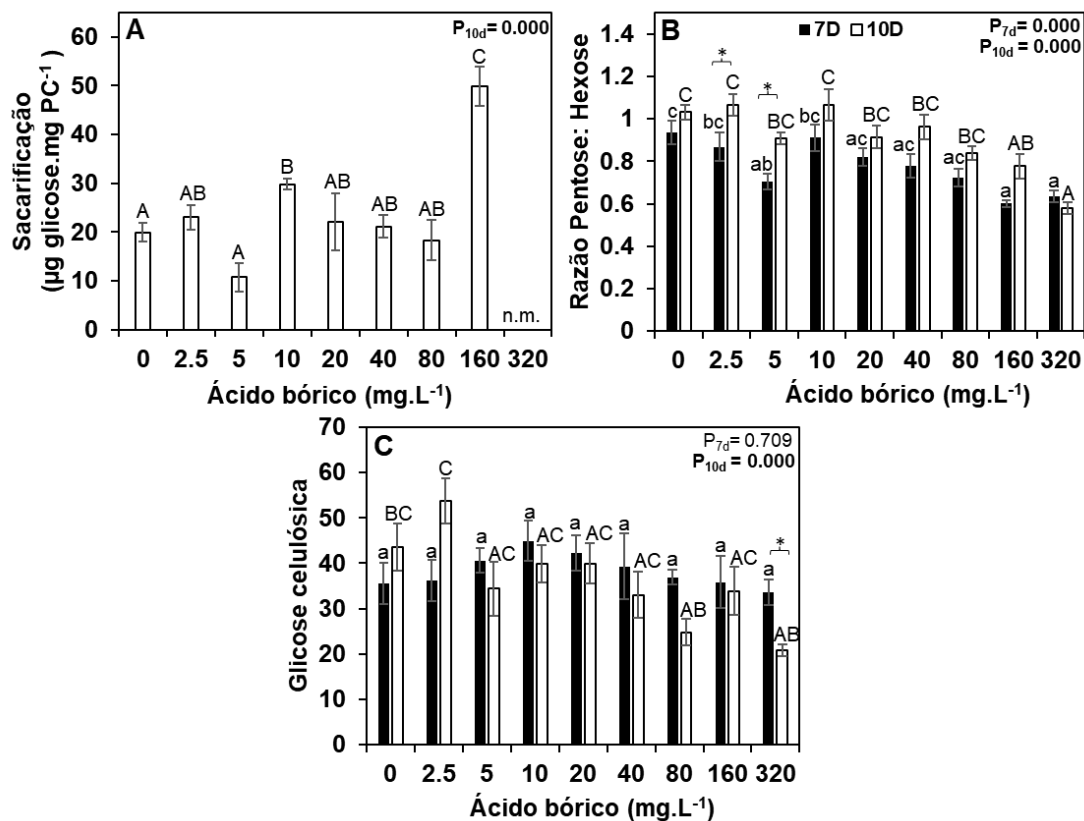


Figura 5.8. Acessibilidade da parede celular de *Spirodela polyrrhiza* cultivada sob diferentes concentrações de ácido bórico. A. Capacidade de sacarificação da biomassa cultivada sob diferentes concentrações de ácido bórico por 10 dias. B. Relação Pentose: Hexose, C. Teor de glicose da celulose. As barras escuras representam dados de 7 dias e as barras claras de 10 dias. Cada tempo avaliado (7 e 10) foi submetido ao teste ANOVA-one way seguido do teste de Tukey ($p < 0,05$) em que letras minúsculas distintas são estatisticamente diferentes em 7 dias e letras maiúsculas são estatisticamente diferentes em 10 dias. Comparações entre 7 e 10 dias foram realizadas com o teste t-Student para cada concentração e os asteriscos são significativos em 95% do intervalo de confiança ($n=5$).

5.5. DISCUSSÃO

O boro total presente nas plantas é 70-90% relacionado às ligações com pectinas, esses polissacarídeos de parede celular atuam como reguladores do equilíbrio do gradiente da assimilação de boro para o metabolismo excedente da planta (BROWN; HU, 1994; HU; BROWN; LABAVITCH, 1996; MATOH; KAWAGUCHI; KOBAYASHI, 1996; O'NEILL et al., 2001; RIAZ et al., 2021). O conteúdo de pectinas está relacionado a demanda de boro e as gramíneas apresentam baixos teores em suas paredes primárias ($3-10 \mu\text{g B.g}^{-1}\text{MS}$), enquanto que eudicotiledôneas têm maiores teores de pectina e maior necessidade de boro ($20-30 \mu\text{g B.g}^{-1}\text{MS}$), já as pteridófitas têm $21 \mu\text{g B.g}^{-1}\text{MS}$, as licófitas $15,1 \mu\text{g B.g}^{-1}\text{MS}$ e as briófitas $12,4 \mu\text{g B.g}^{-1}\text{MS}$ (MATSUNAGA et al., 2004). Por outro lado, as plantas aquáticas demandam maiores teores de boro,

possivelmente devido à baixa disponibilidade desse micronutriente em águas (LEMARCHAND et al., 2000). *S. polyrhiza* foi capaz de assimilar 76% do ácido bórico aos 10 dias de cultivo (**Figura 5.4A**), o qual foi acumulado nos tecidos ($0,08-1,69 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) (**Figura 5.4B**). Outras plantas aquáticas como a flor-de-macaco (*Mimulus guttatus*), trevo d'água (*Marsilea drummondii*) e mare's tail (*Hippuris vulgaris*) podem acumular até $1100 \text{ mg B}\cdot\text{Kg}^{-1}$ MS que é menor quando comparada com a capacidade de *Lemna minor* ($800-1600 \mu\text{g B}\cdot\text{g}^{-1}$ MS) (FRICK, 1985; QIAN et al., 1999).

Os polissacarídeos pécticos formam uma rede alternativa e co-extensiva que unem as paredes à lamela média e transmitem sinais ambientais para as células através de oligossacarídeos para adaptação e/ou ativação de mecanismos de defesa (FLEISCHER; O'NEILL; EHWALD, 1999; MATSUNAGA et al., 2004). O controle dos níveis de pectina de *S. polyrhiza* pode estar relacionado à captação de boro, uma vez que no ponto tóxico ($>80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ B) resultou na redução do crescimento e diminuição do nível de pectina em 26% e de apiose, enquanto que nas concentrações de 2,5 a $40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ B a taxa de crescimento relativo foi aumentada (**Figuras 5.3 e 5.6**). A taxa de crescimento relativa e o acúmulo de biomassa reduziram após $80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e $40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido bórico, respectivamente (**Figura 5.3**). Já outras lentilhas d'águas apresentaram efeitos de toxicidade e influencia no crescimento em concentrações menores de boro ($6-16 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) (DAVIS; DRAKE; MAIER, 2002; GÜR; TÜRKER; BÖCÜK, 2016).

O estresse abiótico, como a toxicidade do boro, causa alteração nos níveis de açúcares solúveis e amido nas plantas (LEMOINE et al., 2013; ROSA et al., 2009). O aumento de boro nas células causa desequilíbrios osmóticos e a formação excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem ser mediadas pelos carboidratos não estruturais (GARCÍA-SÁNCHEZ et al., 2020; HERRERA-RODRÍGUEZ et al., 2010; KHATAR; MOHAMMADI; SHEKARI, 2017; PARIDA; DAS; DAS, 2002; REID, 2007). Os níveis de frutose foram maiores sob privação de boro ($0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e toxicidade ($80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), enquanto que a glicose apresentou um padrão inverso em 7 e 10 dias, com acúmulo em 10 dias em concentrações mais altas de boro (**Figuras 5.5A e 5.5B**). *S. polyrhiza* armazenou três vezes mais rafinose em concentrações altas de boro ($320 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) (**Figura 5.5C**) possivelmente para sinalizar estresse, coordenar o tráfego de

membrana e transporte de mRNA, bem como, atuar como antioxidantes e osmoprotetores (ELSAYED; RAFUDEEN; GOLLDACK, 2014; HANNAH et al., 2006; NISHIZAWA; YABUTA; SHIGEOKA, 2008). Além disso, a toxicidade do boro causou alterações morfológicas no tamanho da colônia de *S. polyrhiza* pela não abscisão do estipe ligando a 'fronde mãe' à 'fronde filha e neta' (**Figura 5.2**). Um fenômeno inverso é relatado para metais pesados (cobre, prata, cádmio, níquel, zinco, alumínio, mercúrio e cromo), que promove a abscisão em um estágio inicial de desenvolvimento e leva à desintegração da colônia pela ruptura da lamela média em lentilhas d'água (LI; XIONG, 2004; TOPP et al., 2011). A remanescência do estipe é a primeira vez descrita, hipotetizando que a não liberação das frondes 'filha' e 'neta' controla o número de novas frondes geradas, e conseqüentemente altera os parâmetros de crescimento. Outra alteração visível do efeito do ácido bórico foi a intensificação da pigmentação (**Figura 5.1**), o que corrobora com o relatado por Gür et al. (2016) e Villavicencio et al. (2007). Além disso, as bordas das frondes são danificadas, sinais de necrose e clorose foram encontrados, como também senescência e morte, conforme descrito por Davis et al., (2002) e Villavicencio et al., (2007) (**Figura 5.1**). Além disso, estudos anteriores demonstraram que maiores concentrações de boro alteram as propriedades de porosidade e tensão da parede levando ao alongamento e alterações na forma celular muitas vezes decorrentes da alteração composição da parede (CAMACHO-CRISTÓBAL; REXACH; GONZÁLEZ-FONTES, 2008; MATOH; KOBAYASHI, 1998).

Os teores de glicose, galactose e arabinose aumentaram 134%, 27% e 47%, respectivamente (**Figura 5.7**), sugerindo uma alteração na ramificação das hemiceluloses e das pectinas que beneficiaram a capacidade de sacarificação desses materiais (**Figura 5.8**). Apiose é o principal açúcar da parede de *S. polyrhiza* e sítio de ancoragem de boro, seus níveis foram reduzidos 24% aos 10 dias na presença de alta concentração de ácido bórico (**Figura 5.7E**). Esse monossacarídeo encontrado em ramnogalacturonanos do tipo II e apiogalacturonanos é sintetizada a partir do nucleotídeo açúcar UDP-apiose, que por sua vez é oriundo da conversão de UDP-glucuronato em UDP-apiose pela enzima AXS. O gene que codifica a enzima AXS é essencial para o crescimento e o desenvolvimento das plantas (AHN et al., 2006; ZHAO et al., 2020). *SpAXS* teve expressão relativa elevada aos 7 dias de cultivo em diferentes

concentrações de boro, tendo maiores valores em 10 mg.L⁻¹ B (**Figura 5.7I**). Essa maior de expressão de *SpAXS* em 10 mg.L⁻¹ B corresponde à maior taxa de crescimento, maior acúmulo de biomassa, maior absorção de boro e elevados níveis de pectina (**Figuras 5.3, 5.4, 5.5 e 5.6**). Esse maior padrão de expressão não está correlacionado com os níveis de apiose, sugerindo um controle pós-transcricional fino. Além disso, os maiores níveis de apiose parecem estar relacionados as maiores taxas de crescimento relativo e acúmulo de biomassa. Um padrão semelhante foi identificado para a xilose, encontrada em xilogalacturonanos e hemiceluloses (**Figuras 5.7F e 5.7J**). Essas duas pentoses (xilose e apiose) estão relacionadas à evolução do código glicômico de Lemnaceae em que Lemnoideae (*Spirodela*, *Landoltia* e *Lemna*) apresentam elevados teores de apiogalacturonanos (apiose) e Wolffioideae (*Wolffia* e *Wolffioideae*) apresentam elevados teores de xilogalacturonanos (AVCI; PEÑA; O'NEILL, 2018; BUCKERIDGE, 2017), portanto espera-se uma resposta semelhante por parte desses monossacarídeos.

A correlação entre apiose, crescimento e acúmulo de amido em lentilhas d'água já é conhecida (PAGLIUSO et al., 2018). O acúmulo de amido foi proeminente em 7 dias, principalmente para 160 e 320 mg.L⁻¹ B (**Figura 5.5E**). Isso sugere uma resposta mais rápida da planta em acumular mais amido em altas concentrações de boro o que resultou em uma baixa taxa de crescimento. O acúmulo de amido e a remodelação da parede é um mecanismo conhecido em lentilhas de água para se adaptar e sobreviver às mudanças climáticas e superfícies de congelamento da água (LONGLAND; FRY; TREWAVAS, 1989). Portanto, o aumento de amido e glicose e a redução de apiose como resposta à absorção de boro dentro das células vegetais, a alteração da colônia de *S. polyrhiza* e a redução de fronde podem estar mimetizando a formação de turion para escapar da toxicidade do boro.

5.6. CONCLUSÃO

O boro altera o tamanho e as ligações das frondes das colônias de *S. polyrhiza*, causando a não liberação das frondes filhas, netas e bisnetas o que altera os parâmetros de crescimento e o ciclo de vida da planta, a qual reflete na alocação de carbono. Os carboidratos não estruturais amido e rafinose aumentam de acordo com o tempo e as concentrações de ácido bórico em que

a planta foi crescida. Por outro lado, os carboidratos estruturais apresentaram redução no teor de pentose com excesso de glicose e galactose. Além disso, *SpAXS* é hipotetizada como um gene capaz de incrementar o crescimento em *S. polyrhiza*, que tem um controle extremamente fino para a apiose sintetizada, um agente estabilizador de boro.

5.7. REFERÊNCIAS

AHN, J. W. et al. Depletion of UDP-D-apiose/UDP-D-xylose synthases results in rhamnogalacturonan-II deficiency, cell wall thickening, and cell death in higher plants. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 19, p. 13708–13716, 12 maio 2006.

AMARAL, L. I. V. DO et al. **Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais** *Hoehnea*. [s.l.: s.n.].

APPENROTH, K. J.; BORISJUK, N.; LAM, E. Telling duckweed apart: Genotyping technologies for the Lemnaceae. **Chinese Journal of Applied and Environmental Biology**, v. 19, n. 1, p. 1–10, 2013.

AVCI, U.; PEÑA, M. J.; O'NEILL, M. A. Changes in the abundance of cell wall apiogalacturonan and xylogalacturonan and conservation of rhamnogalacturonan II structure during the diversification of the Lemnoideae. **Planta**, n. 0123456789, 2017.

AVCI, U.; PEÑA, M. J.; O'NEILL, M. A. Changes in the abundance of cell wall apiogalacturonan and xylogalacturonan and conservation of rhamnogalacturonan II structure during the diversification of the Lemnoideae. **Planta**, v. 247, n. 4, p. 953–971, 1 abr. 2018.

BLEVINS, D. G.; LUKASZEWSKI, K. M. Boron in Plant Structure and Function. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 481–500, 1998.

BROWN, P. H.; HU, H. Boron uptake by sunflower, squash and cultured tobacco cells. **Physiologia Plantarum**, v. 91, n. 3, p. 435–441, 1 jul. 1994.

BUCKERIDGE, M. S. The evolution of the Glycomic Codes of extracellular matrices. **BioSystems**, v. 164, p. 112–120, 1 fev. 2017.

CAMACHO-CRISTÓBAL, J. J.; REXACH, J.; GONZÁLEZ-FONTES, A. Boron in plants: Deficiency and toxicity. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, n. 10, p. 1247–1255, 2008.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. 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**, v. 3, n. 1, p. 1–30, 1993.

DAVIS, S. M.; DRAKE, K. D.; MAIER, K. J. Toxicity of boron to the duckweed, *Spirodella polyrrhiza*. **Chemosphere**, v. 48, n. 6, p. 615–620, 2002.

DE SOUZA, A. P. et al. Composition and Structure of Sugarcane Cell Wall Polysaccharides: Implications for Second-Generation Bioethanol Production.

Bioenergy Research, v. 6, n. 2, p. 564–579, jun. 2013.

ELSAYED, A. I.; RAFUDEEN, M. S.; GOLLDACK, D. Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: Protection against abiotic stress. **Plant Biology**, v. 16, n. 1, p. 1–8, 2014.

FILISSETTI-COZZI, T. M. C. C.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Analytical Biochemistry**, v. 197, n. 1, p. 157–162, 15 ago. 1991.

FLEISCHER, A; O'NEILL, M.; EHWALD, R. The Pore Size of Non-Graminaceous Plant Cell Walls Is Rapidly Decreased by Borate Ester Cross-Linking of the Pectic Polysaccharide Rhamnogalacturonan II. **Plant physiology**, v. 121, n. 3, p. 829–838, 1999.

FRICK, H. Boron tolerance and accumulation in the duckweed, *Lemna minor*. **Journal of Plant Nutrition**, v. 8, n. 12, p. 1123–1129, 1985.

GARCÍA-SÁNCHEZ, F. et al. Multiple stresses occurring with boron toxicity and deficiency in plants. **Journal of Hazardous Materials**, v. 397, p. 122713, 5 out. 2020.

GLANDON, R. P.; MCNABB, C. D. The uptake of boron by *Lemna minor*. **Aquatic Botany**, v. 4, p. 53–64, 1978.

GÜR, N.; TÜRKER, O. C.; BÖCÜK, H. Toxicity assessment of boron (B) by *Lemna minor* L. and *Lemna gibba* L. and their possible use as model plants for ecological risk assessment of aquatic ecosystems with boron pollution. **Chemosphere**, v. 157, p. 1–9, 2016.

HANNAH, M. A. et al. Transport and metabolism of raffinose family oligosaccharides in transgenic potato. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 14, p. 3801–3811, 2006.

HERRERA-RODRÍGUEZ, M. B. et al. Role of Boron in Vascular Plants and Response Mechanisms to Boron Stresses. **Plant Stress**, v. 4, n. 2, p. 115–122, 2010.

HU, H.; BROWN, P. H.; LABAVITCH, J. M. Species variability in boron requirement is correlated with cell wall pectin. **Journal of Experimental Botany**, v. 47, n. 2, p. 227–232, 1996.

KHATAR, M.; MOHAMMADI, M. H.; SHEKARI, F. Some physiological responses of wheat and bean to soil salinity at low matric suctions. **International Agrophysics**, v. 31, n. 1, p. 83–91, 1 jan. 2017.

LAM, E. et al. Duckweed in bloom: The 2nd International Conference on Duckweed Research and Applications heralds the return of a plant model for plant biology. **Plant Molecular Biology**, v. 84, n. 6, p. 737–742, 2014.

LANDOLT, E. **Lemnaceae Duckweed Family** *Journal of the Arizona-Nevada academy of science*, 1992.

LEMARCHAND, D. et al. The influence of rivers on marine boron isotopes and implications for reconstructing past ocean pH. **Nature** **2000 408:6815**, v. 408, n. 6815, p. 951–954, 21 dez. 2000.

- LEMOINE, R. et al. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. July, p. 1–21, 2013.
- LES, D. H. D. et al. Phylogeny and Systematics of Lemnaceae, the Duckweed Family. **Systematic Botany**, v. 27, n. 2, p. 221–240, 1 abr. 2002.
- LI, T. Y.; XIONG, Z. T. Cadmium-induced colony disintegration of duckweed (*Lemna paucicostata* Hegelm.) and as biomarker of phytotoxicity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 59, n. 2, p. 174–179, 2004.
- LIU, C. et al. Boron accumulation by *Lemna minor* L. under salt stress. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–6, 2018.
- LONGLAND, J. M.; FRY, S. C.; TREWAVAS, A. J. **Developmental Control of Apiogalacturonan Biosynthesis and UDP-Apiose Production in a Duckweed** *Plant Physiol.* [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.plantphysiol.org>. Acesso em: 28 ago. 2020.
- LOOMIS, W. D.; DURST, R. W. Chemistry and biology of boron. **BioFactors (Oxford, England)**, v. 3, n. 4, p. 229–39, 1 abr. 1992.
- MATOH, T. Boron in plant cell walls. **Plant and Soil**, v. 193, n. 1, p. 59–70, 1997.
- MATOH, T.; KAWAGUCHI, S.; KOBAYASHI, M. Ubiquity of a Borate-Rhamnogalacturonan II Complex in the Cell Walls of Higher Plants. **Plant and Cell Physiology**, v. 37, n. 5, p. 636–640, 1996.
- MATOH, T.; KOBAYASHI, M. Boron and calcium, essential inorganic constituents of pectic polysaccharides in higher plant cell walls. **Journal of Plant Research**, v. 111, n. 1, p. 179–190, 1998.
- MATSUNAGA, T. et al. Occurrence of the primary cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II in pteridophytes, lycophytes, and bryophytes. Implications for the evolution of vascular plants. **Plant physiology**, v. 134, n. 1, p. 339–351, 2004.
- NISHIZAWA, A.; YABUTA, Y.; SHIGEOKA, S. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. **Plant Physiology**, v. 147, n. 3, p. 1251–1263, 2008.
- O'NEILL, M. A. et al. Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for *Arabidopsis* growth. **Science**, v. 294, n. 5543, p. 846–849, 2001.
- ORON, G. Duckweed culture for wastewater renovation and biomass production. **Agricultural Water Management**, v. 26, n. 1–2, p. 27–40, 1 set. 1994.
- ORON, G.; PORATH, D.; JANSEN, H. Performance of the duckweed species *Lemna gibba* on municipal wastewater for effluent renovation and protein production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 29, n. 2, p. 258–268, 1987.
- PAGLIUSO, D. et al. Correlation of apiose levels and growth rates in duckweeds. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, n. JUL, p. 1–10, 2018.
- PAGLIUSO, D. et al. High Saccharification, Low Lignin, and High Sustainability Potential Make Duckweeds Adequate as Bioenergy Feedstocks. **Bioenergy Research**, p. 1–11, 2 nov. 2020.

PARIDA, A.; DAS, A. B.; DAS, P. NaCl stress causes changes in photosynthetic pigments, proteins, and other metabolic components in the leaves of a true mangrove, *Bruguiera parviflora*, in hydroponic cultures. **Journal of Plant Biology** **2002** **45:1**, v. 45, n. 1, p. 28–36, mar. 2002.

QIAN, J.-H. et al. Phytoaccumulation of Trace Elements by Wetland Plants: III. Uptake and Accumulation of Ten Trace Elements by Twelve Plant Species. **Journal of Environmental Quality**, v. 28, n. 5, p. 1448–1455, 1 set. 1999.

REID, R. Physiology and Metabolism of Boron in Plants. **Advances in Plant and Animal Boron Nutrition**, p. 83–90, 7 jun. 2007.

RIAZ, M. et al. Boron-toxicity induced changes in cell wall components, boron forms, and antioxidant defense system in rice seedlings. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 216, p. 112192, 2021.

ROSA, M. et al. Soluble sugars--metabolism, sensing and abiotic stress: a complex network in the life of plants. **Plant signaling & behavior**, v. 4, n. 5, p. 388–93, maio 2009.

RUIJTER, J. M. et al. Amplification efficiency: Linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 6, 2009.

SOWINSKI, E. E. et al. Linkage structure of cell-wall polysaccharides from three duckweed species. **Carbohydrate Polymers**, v. 223, n. July, p. 115119, 2019.

TOPP, C. et al. A novel mechanism of abscission in fronds of *Lemna minor* L. and the effect of silver ions. **Plant Biology**, v. 13, n. 3, p. 517–523, 2011.

VILLAVICENCIO, M. S.; SILVA, C. Á.; ARCE, G. M. Boron toxicity in *Lemna gibba*. **Hidrobiologica**, v. 17, n. 1 SUPPL., p. 1–6, 2007.

ZHAO, X. et al. UDP-Api/UDP-Xyl synthases affect plant development by controlling the content of UDP-Api to regulate the RG-II-borate complex. **The Plant Journal**, p. 1–16, 2020.

ZIEGLER, P. et al. Relative in vitro growth rates of duckweeds (Lemnaceae) - the most rapidly growing higher plants. **Plant biology (Stuttgart, Germany)**, v. 17, n. Fao 2013, p. 1–9, 2014.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

O crescimento populacional traz uma preocupação global em relação ao acesso a comida, água potável e energia, portanto o desenvolvimento sustentável é de suma importância para a saúde e bem-estar da sociedade do futuro. Pensando nisso, alternativas verdes têm sido buscadas em vários aspectos do desenvolvimento de cidades.

As lentilhas d'água, são as menores plantas aquáticas do mundo, mas apresentam um potencial gigantesco para diversas aplicações. A presente tese tem como temática o estudo do gene *UDP-apiose/UDP-xilose sintase (AXS)* a partir de uma abordagem sistêmica do desenvolvimento da planta com redução e aumento de sua expressão, bem como, sua regulação dependente da disponibilidade de boro a fim de responder (1) Qual a importância da apiose na parede celular, no metabolismo de carboidratos e no crescimento de *S. polyrhiza*? e (2) Qual a relação da síntese de apiogalacturonano com o gene *AXS*?

O estado da arte sobre transformações de lentilhas d'água e o mecanismo de síntese de apiogalacturonanos ainda é um campo que precisa estudos. A bibliometria realizada relacionada sobre transformações em lentilhas d'água resultaram em apenas 27 trabalhos relevantes sobre o processo, demonstrando a necessidade de aprofundamento nesta área, uma vez que as lentilhas d'água podem ser utilizadas como biofábricas para o desenvolvimento de produtos tecnológicos de alto valor agregado. Embora essas plantas tenham sido utilizadas como modelos nas décadas de 60 e 70 (como por exemplo: desvendar o processo de floração) pararam de ser amplamente empregadas e somente na geração das ômicas têm se voltado seus estudos. Pelo fato das lentilhas d'água serem encontradas globalmente, mas apenas terem 37 espécies, seus ecótipos respondem de maneiras diferentes aos processos de cultura de tecidos, etapa essencial para ferramentas biotecnológicas e transformações gênicas. Isso demonstra mais uma vez a necessidade do desenvolvimento de protocolos. A maioria dos estudos disponíveis utiliza essas plantas para a produção de proteínas recombinantes e não essencialmente na modificação do vegetal, como foi o caso do presente estudo. As transformações de *S. polyrhiza* em sistema por fronde mediado por *A. tumefaciens* resultaram em possíveis quimeras que, com

a reprodução clonal a homogeneidade dos transgenes. Por outro lado, as transformações a partir de calos de *L. minor* foram mais estáveis. Em ambos os casos, os controles com vetores vazios apresentaram variações em relação ao selvagem, instigando o real efeito da transformação genética. Ainda, as análises de parede e de expressão gênica das plantas selvagens apresentam altas flutuações, dificultando as mensurações reais da influência de AXS sobre lentilhas d'água. Entretanto, foi possível identificar um padrão de resposta para o silenciamento e superexpressão de AXS. Para o silenciamento, todo o dreno da parede foi reduzido e houve o acúmulo de amido, enquanto para os eventos de superexpressão o conteúdo de amido foi reduzido e a parede se manteve sem alteração. As evidências são consistentes com a hipótese de que a expressão de AXS não está diretamente relacionada ao conteúdo de apiose, e consequentemente de ramnogalacturonanos do tipo II e apiogalacturonanos, sugerindo um controle fino de regulação pós-traducional, ou ainda, etapas não elucidadas da transferência do nucleotídeo-açúcar (NDP-apiose) para o polissacarídeo na via de estudo demonstrada no **Capítulo I**. Esse controle indireto da expressão e do açúcar é bem evidente no experimento com diferentes concentrações de boro, em que aos 7 dias a expressão de AXS aumentou 9 vezes sem que um aumento da mesma grandeza ocorresse no monossacarídeo apiose (concentração de 10 mg.L⁻¹ B).

Ao avaliar o efeito do boro sob o crescimento e a composição da parede de *S. polyrhiza* fica clara a relação da assimilação de boro com a alocação de carbono e o crescimento, oferecendo validação da hipótese inicial desta tese de que os elevados teores de apiose estão relacionados com a demanda de boro pela planta e sua consequente necessidade de assimilação leva ao crescimento acelerado das lentilhas d'água apresentando uma relação antagônica com o acúmulo de amido. Ainda, o efeito de boro em concentrações acima de 40 mg.L⁻¹ reduziu o conteúdo de pentoses da biomassa, favorecendo a sacarificação e a possível utilização de *S. polyrhiza* para remediação de águas contaminadas com boro e produção de bioenergia.

As características das lentilhas d'água de acumularem uma grande biomassa em curto tempo em conjunto com manejo simples e de terem um genoma pouco redundante, permitem o uso desta planta na produção de

alimentos, cosméticos, bioenergia, biorefinaria, farmácia, remediação de águas e demais aplicações biotecnológicas.

APÊNDICES

APÊNDICES

APÊNDICE A – referente ao material suplementar do Capítulo I

Apêndice 1.1. Genes relacionados à via dos nucleotídeos-açúcar de *Arabidopsis thaliana* e *Spirodela polyrhiza*. Os genes de síntese da parede celular de *S. polyrhiza* foram recuperados dos ortólogos de *A. thaliana*. Dois genomas de *S. polyrhiza* foram usados (linhagem 7498 e 9509). *S. polyrhiza_V2* representa a versão anotada gerada no presente trabalho. ^a é transcrito selecionado para o design do oligonucleotídeos (arquivo em excel).

Apêndice 1.2. Similaridade entre os ortólogos de *Spirodela polyrhiza* 7498 e *Arabidopsis thaliana*. A tabela resume os resultados da blastp. (arquivo em excel).

Apêndice 1.3. Similaridade entre os ortólogos de *Spirodela polyrhiza* 7498 e *Spirodela polyrhiza* 9509. A tabela resume os resultados da blastp (arquivo em excel).

Apêndice 1.4. Similaridade entre os ortólogos de *Spirodela polyrhiza* 9509 e a anotação *Spirodela polyrhiza_V2*. A tabela resume os resultados da blastn. As colunas Início 9509 e Fim 9509 denotam o intervalo de genes do banco de anotações gerado no presente trabalho (arquivo em excel).

Apêndice 1.5. Anotação de domínio das sequências dos genes relacionados a via dos nucleotídeos açúcares de *Arabidopsis thaliana* no HMMERscan (arquivo em excel).

Apêndice 1.6. Anotação de domínio das sequências dos genes relacionados a via dos nucleotídeos açúcares de *Spirodela polyrhiza* 7498 no HMMERscan (arquivo em excel).

Apêndice 1.7. Anotação de domínio das sequências dos genes relacionados a via dos nucleotídeos açúcares de *Spirodela polyrhiza_V2* no HMMERscan (arquivo em excel).

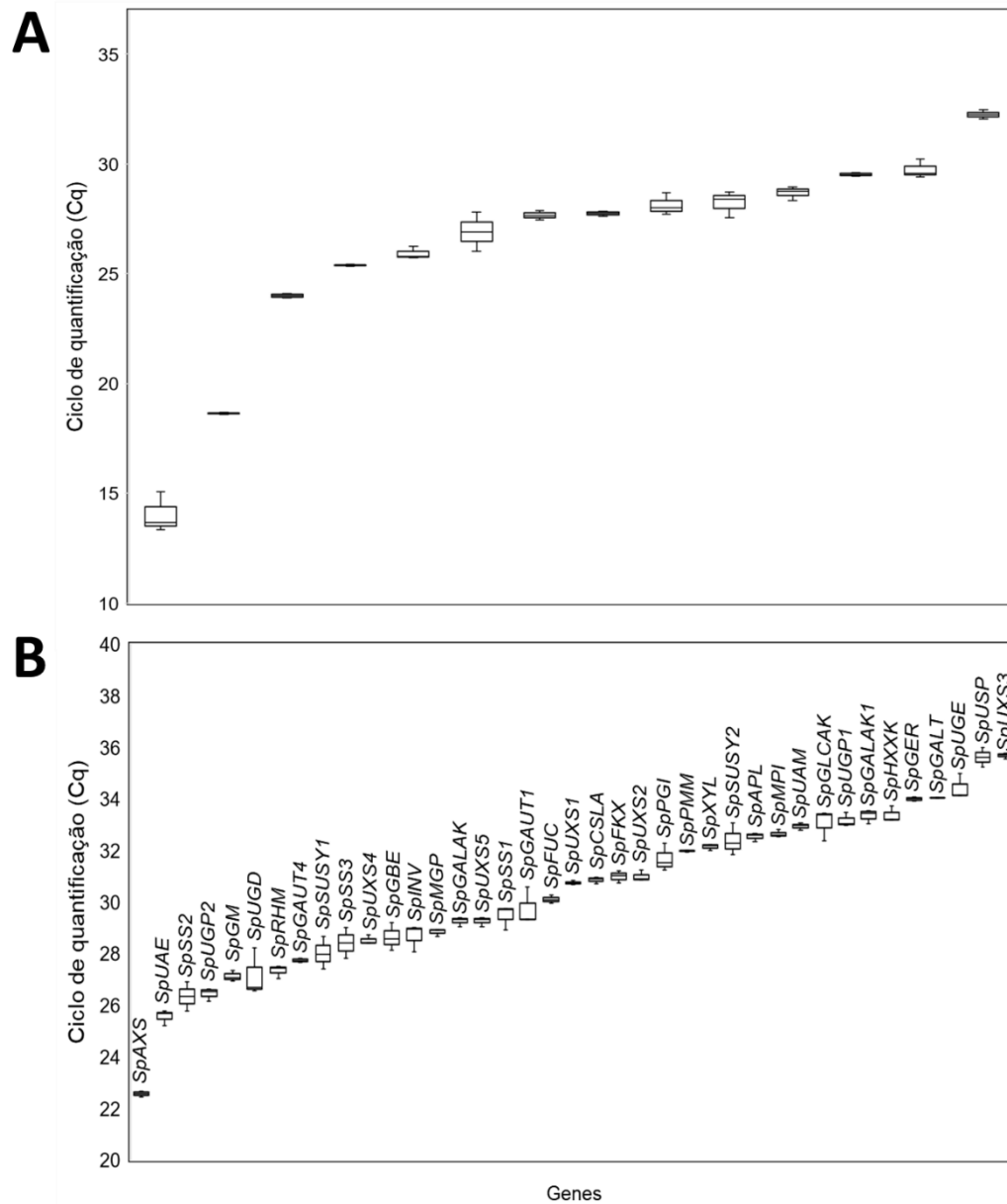
Apêndice 1.8. Candidatos selecionados à genes de referência. Candidatos à genes de referência para *Spirodela polyrhiza* foram recuperados das sequências de ortólogos de *Arabidopsis thaliana*. Dois genomas de *S. polyrhiza* foram usados (linhagem 7498 e 9509).

Nome do gene	Abreviação do gene	<i>A. thaliana</i> loci	<i>S. polyrhiza</i> (7498) loci	<i>S. polyrhiza</i> (9509) loci
L18A-1 proteína ribossomal 60S	<i>60S</i>	AT1G29970	Spipo1G0011100 ^a	CP019095.1:673302-673645
Proteína 7 relacionada a actina	<i>ARP7</i>	AT3G60830	Spipo8G0025300 ^a	N.I.
Ciclofilina	<i>CYP</i>	AT2G21130	Spipo1G0064300 ^a	CP019095.1:4109686-4110107
Fator de alongação 1- α	<i>EF-1α</i>	AT5G60390	Spipo2G0041800 ^a	CP019096.1:5300971-5301855
Fator de iniciação de tradução 4B	<i>ELF4B</i>	AT4G38710	Spipo11G0042800 ^a	CP019100.1:1305693-1306966
Proteína da família F-BOX	<i>FBOX</i>	AT5G15710	Spipo5G0021900 ^a	CP019102.1:6068819-5069783
Proteína fosfatase 2 ^a	<i>PP2A</i>	AT1G59830	Spipo9G0010500 ^a	CP019098.1:793528-793721
Subunidade D1	<i>PSAB</i>	ATCG00340	Spipo0G0152800 ^a	CP019100.1:4205112-4205381
Proteína ribossomal S24	<i>S24</i>	AT3G04920	Spipo18G0006200 ^a	CP019111.1:1346957-1347129
Tubulina de cadeia α 3/ α 5	<i>TUA5</i>	AT5G19780	Spipo2G0065400 ^a	CP019096.1:3753796-3754314
Enzima conjugadora de ubiquitina	<i>UBC9</i>	AT4G27960	Sipo18G0010900 ^a	CP019111.1:1602053-1602198
Ubiquitina 7	<i>UBQ7</i>	AT2G35635	Spipo17G0036400 ^a	CP019110.1:770962-771226
rRNA de subunidade pequena metiltransferase NEP1	<i>18S</i>	AT3G57000	Spipo14G0036800 ^a	CP019101.1:2319445-2321809

Apêndice 1.9. Desenho de oligonucleotídeos de candidatos a genes de referência e genes da via de nucleotídeos-açúcares

Gene	Transcrito	5'-Forward primer-3'	5'-Reverse primer-3'
60 S	Spipo1G0011100	GAAGTGAGGGCGAAGTCCAA	GTTACAGCGTCGTGTCCCG
ARP7	Spipo8G0025300	TTCACCGAACCGCTCTGC	TTCCCGTGTCCAATGTCAAC
CYP	Spipo1G0064300	CAAGCCCCTCCACTACAAGG	TTGCCGTCCAGCCAAGAC
EF1	Spipo2G0041800	GGACCTGAAGAGAGGGTTCG	ACTTGACGGCGATGTGGG
ELF4B	Spipo11G0042800	GCAGGACGGGTGATGGATTG	CCAGAGGCAATGTTCTGTGGT
FBOX	Spipo5G0021900	CCCACCAAGAACAGTCGCTT	TCAGATAATGCCCGCCGGTT
PP2A	Spipo9G0010500	GGACTATGTGGACCGTGGAT	ACCAGTGCTGTCAGAAGGAAA
PSAB	Spipo0G0152800	AGTTTATCGGTCTGGGCGTG	CACTGGCTTATCTCTCCATCG
S24	Spipo18G0006200	CTTCGTGTTCAAGTTCGCA	GCCCTGTTCTTCTCTCCTT
TUA5	Spipo2G0065400	GGAGTGCGCTGGACATTGAG	GAGGATACGGCAGGAGGTTG
UBQ 9	Spipo18G0010900	CCATTCAAACCACCCAAGGT	ATCCGTCAGCAACGAGCAAA
UBQ7	Spipo17G0036400	CATCCCTCCAGACCAGCAG	TGAATCCCTTCTTCTCTCTCG
18S_SP9509	Spipo14G0036800	ACGCAACTGGTAAACGGGAA	AGACAAGGGTGGCATCAT
18S_LM		ACGCAACTGGTAAACGGGAA	AGACAAGGGTGGCATCATCG
RHM	Spipo0G0113900	ACCCGGTCTTCCATAAATC	AGTTCGATGGAGCAGAGGAA
USP	Spipo8G0011100	TGCATCAATGTGAGCCTAATC	CTCCCGCAACAAGAACAAT
GlcAK	Spipo22G0034600	ATGATCGAGACGGCCAGA	CTCGTCACGGAGGACTGAAG
GALAK	Spipo12G0062100	GCTCACTGTTTCAGGCTCATT	ACCTTGACAGTTCATGGAGGT
	Spipo12G0062100	GTCCATCCCCAAAAATCATCC	TCACGGCACTCGGGCAACT
UGD	Spipo2G0088200	ACCCGATGTCTCTGAGCTTG	GCCCTCGACTACCAGAAGAT
	Spipo3G0034000	GAGGAAGGAGAACGTATGC	CTTGACGGGGTTGAAC TTGT
	Spipo23G0021600	CTCTGCCGGAAGTCTCTT	GTTGAACGTGGTGGAGAACA
UXS	Spipo6G0070800	TCCTGGGCCTACATTATCCA	CGCTATGAAGTTGTGTACCA
	Spipo22G0035200	TTGATGGCGAGAGGGGAGA	GGCAAGCGAGGTGGTAAAT
	Spipo22G0035300	GCAAGCAACCCTCACAGTC	CCTTCACAACCTCGGCAAGC
AXS	Spipo0G0011100	ATACAGCCCTCAAACCGCAA	TTCTACGGGGAAGGCTACGA
Xyl	Spipo2G0126000	GCAACTTCTCTCGCTACACCTT	CCGTTGACCTTGTGTAGGA
UAE	Spipo32G0004600	TGCTGGGATTCGCTAAGTTT	ACCGAGATTTATGTAGCCGCC
ARA 1	Spipo12G0062800	CGCACTTATGGAGTCAGGTCAC	CGAGGATTTCTTTGCTGCTTCG
UAM	Spipo4G0054400	ATGAATGGGGCATGATTTGT	CTCCGCTTTTGAATTCCTCTG
MPI	Spipo8G0066600	CCGAAAGACCAGAGTTTGCT	CCTGATCGTCAACGAGATTG
PMM	Spipo1G0035200	GGCTGGCAGTTTCTCATTTT	TCTCCCGTTTCTCTCTTTG
MGP	Spipo23G0012100	TGGGCATCAAGATCACCT	GACGTCGCTGTTTCATTACGA
GER	Spipo12G0050600	ACCATTTGTACGTCTGCTTCC	TTTGAAGGGGATCTCGTCTG
CSLA	Spipo0G0050900	ACGGCTTGTGATGTTCTCC	GGGTGAATGAGTGGATCGTT
PGI	Spipo4G0014300	TGAGCGCAAGTAAGAAAAGG	AGATCAGGGAACCCTGTGAA
APL/APS	Spipo28G0001400	CACAGAGAAACGGATGCAGA	CCTTTGGCTTCTCAGCAAAC
UGP	Spipo7G0027800	TTGCCGAGAAGAAGATCCAC	TTCTTCACTGGGGCAAACCTC
	Spipo16G0026600	GCGGAACCTTGATCTGGGTTA	CAGCTACCCTCGGGAAAAA
SUSY	Spipo1G0051200	TCTGTGGAACCAACGGATT	AACTTCTGGAAGGGGGTGT
	Spipo2G0031600	TGAATGGCATGAGAAGTGG	CATGCCTTCATCTCCAGTGT
INV	Spipo0G0002200	CGCGTATTTCTCGAGTTTT	AAAACACAGCAAGTGGGTCA
FK	Spipo6G0075900	GGTCTGTCTCGAGGTGAA	TCAAGATCCTGTTCTGTGACC
HXK	Spipo6G0009800	AAGGAAGAAGCGAGATGGT	GCTGGGATGTTCTCACATTTT
FKGP	Spipo1G0101100	TCGTTCTTGTCTGGAACAG	AGCTCGAGGTGCATTTGATT
SBE	Spipo1G0057400	GAAGGTGGAGTGGGTTTTGA	GGCACGAGACGATTTCTTTT
	Spipo0G0050800	TCTGCAGCAACCAAGATGAC	GATCAACCCGAGGAATCTCA
	Spipo1G0057900	CAACTGGATGAAAGCTGCAA	AGGTCAGCTCTTCGGCATAA
GAUT	Spipo26G0026900	GAAGTTCATCAAGGCCACTACC	CCCAGGTAAGCGGTCAATA
	Spipo12G0021200	TTCTACCTCCCCGAGGTCTT	TCGTCCAAGAAGAGCACCTT
	Spipo2G0012100	AGGACATCACCGGCATCTAC	CATGGGTTCTTCGGTTGACT
UGE	Spipo13G0028800	AATACCGGCCCTTGTATCC	GCTGGTTGTCGAAAGACTCC
	Spipo18G0016400	GCCATGACTTCCAACAAGT	GTTACAGTGCAGGTTTGATG

Apêndice 1.10. Valores do ciclo de amplificação (Cq) dos genes de referência e de nucleotídeos-açúcares. A. Distribuição Cq de candidatos à genes de referência de *S. polyrhiza*. B. Distribuição Cq de genes da via de nucleotídeos-açúcares para a síntese da parede celular de *S. polyrhiza*. A mediana é representada pela linha espessa. As caixas brancas e suas marcações indicam os interquartil e o Cq a variância de cada gene.



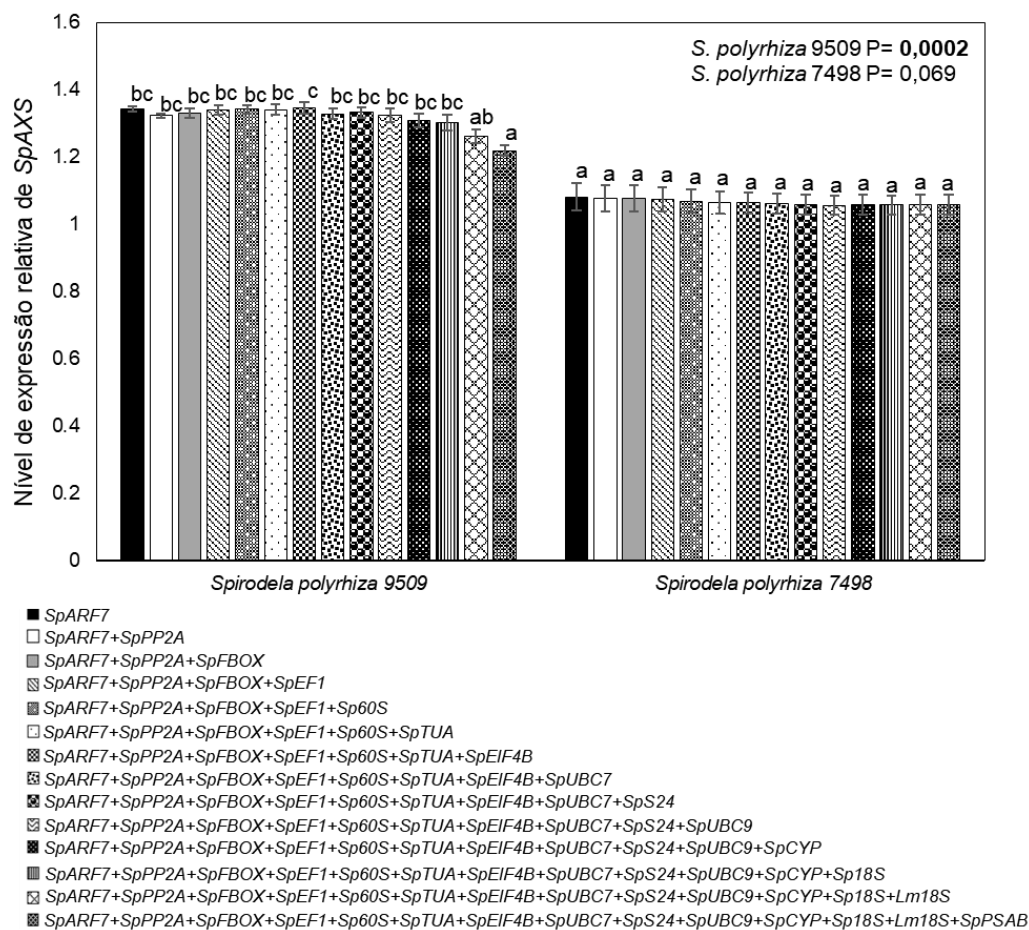
Apêndice 1.11. Ranqueamento dos genes de referência candidatos de *Spirodela polyrhiza*, baseado na análise do software geNorm. M refere-se ao coeficiente de estabilidade da variação média de dois genes de controle interno. Os genes mais estáveis têm menores valores de M (cut-off <1,5). V corresponde aos valores de variação par-a-par de $V_n/n+1 < 0,15$.

Ranqueamento	M
<i>ARF7</i>	0,336
<i>PP2A</i>	0,347
<i>FBOX</i>	0,328
<i>EF1</i>	0,315
<i>60S</i>	0,332
<i>TUA</i>	0,334
<i>EIF4B</i>	0,351
<i>UBC7</i>	0,373
<i>S24</i>	0,389
<i>UBC9</i>	0,404
<i>CYP</i>	0,446
<i>18S</i>	0,812
<i>18S_LM</i>	1,581
V	
V2/3	0,065
V3/4	0,051
V4/5	0,054
V5/6	0,042
V6/7	0,042
V7/8	0,034
V8/9	0,036
V9/10	0,035
V10/11	0,055
V11/12	0,064
V12/13	0,119
V13/14	0,134

Apêndice 1.12. Ranqueamento dos genes de referência candidatos de *Spirodela polyrhiza* baseado na análise do software NormFinder. Genes ranqueados de acordo com a menor variação intra-grupo. Genes com os menores valores de estabilidade são considerados os de expressão mais estáveis.

Ranqueamento	M
<i>ARF7</i>	0.336
<i>PP2A</i>	0.347
<i>FBOX</i>	0.328
<i>EF1</i>	0.315
<i>60S</i>	0.332
<i>TUA</i>	0.334
<i>EIF4B</i>	0.351
<i>UBC7</i>	0.373
<i>S24</i>	0.389
<i>UBC9</i>	0.404
<i>CYP</i>	0.446
<i>18S</i>	0.812
<i>18S_LM</i>	1.581
v	
V2/3	0.065
V3/4	0.051
V4/5	0.054
V5/6	0.042
V6/7	0.042
V7/8	0.034
V8/9	0.036
V9/10	0.035
V10/11	0.055
V11/12	0.064
V12/13	0.119
V13/14	0.134

Apêndice 1.13. Validação de genes de referência. O gráfico mostra os níveis de expressão relativa de AXS nas amostras de duas linhagens de *Spirodela polyrhiza* (7498 e 9509) normalizadas com quatorze combinações de candidatos a genes de referência. As diferentes letras acima das barras indicam estatisticamente significante ($p < 0,05$) na linhagem de *S. polyrhiza* testada pelo teste de Tukey.



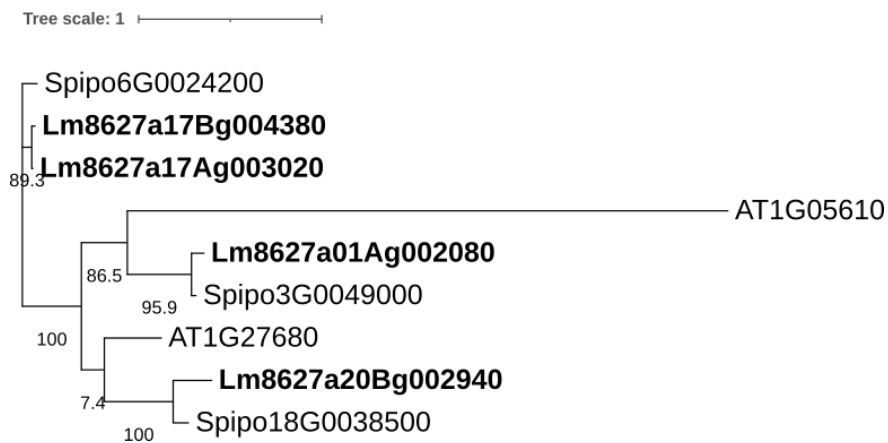
APÊNDICE B – referente ao material suplementar do Capítulo II

Apêndice 2.1. Tabela de iniciadores com sua correspondência ao gene e transcrito de *Lemna minor* 8627 (arquivo em excel).

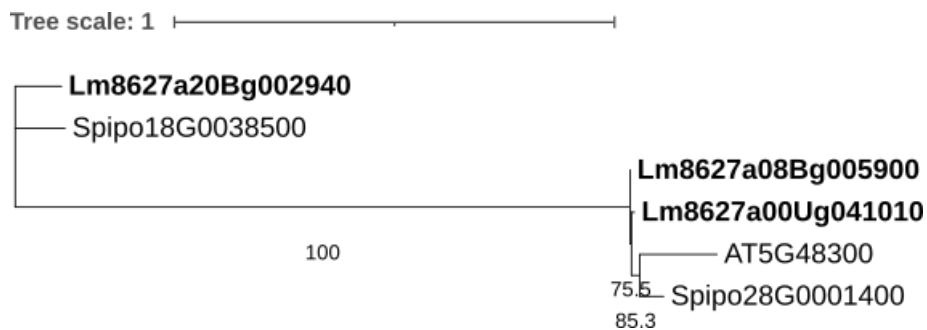
Apêndice 2.2. Identidade entre os ortólogos de *Lemna minor* 8627, *Spirodela polyrhiza* 7498 e *Arabidopsis thaliana*. A tabela resume os resultados obtidos na busca de ortólogos pelo software Ortofinder (arquivo em excel).

Apêndice 2.3. Anotação de domínios das sequências dos genes relacionados a via dos nucleotídeo-açúcares de *Lemna minor* 8627 no HMMERscan (arquivo em excel)

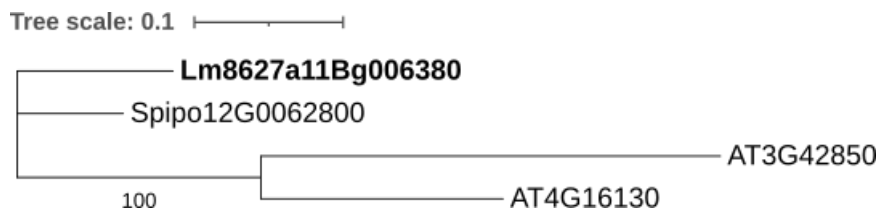
Apêndice 2.4. Grafo de Glucose 1-fosfato adeniltransferase (subunidade grande) (APL).



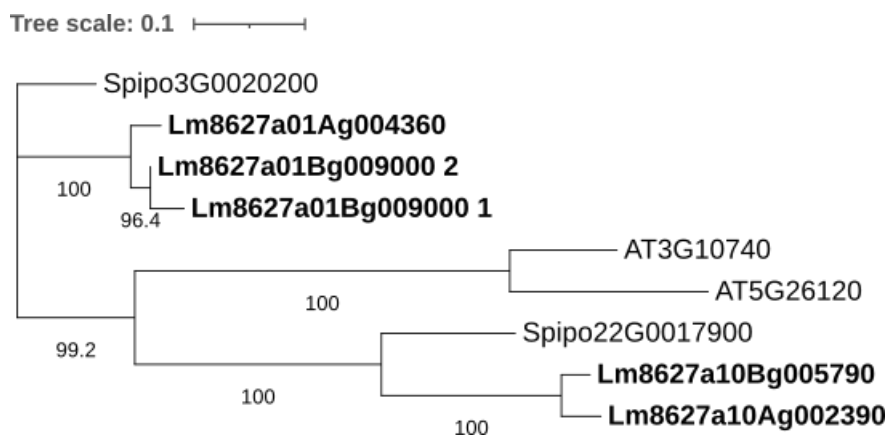
Apêndice 2.5. Grafo de Glucose 1-fosfato adeniltransferase (subunidade pequena) (APS).



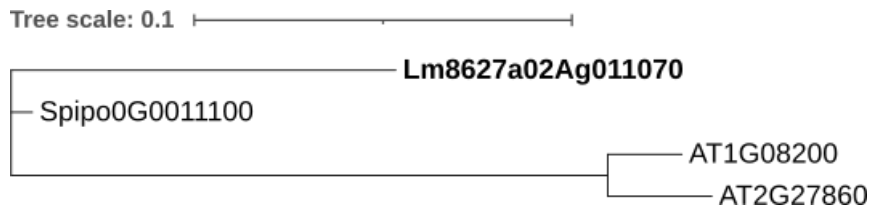
Apêndice 2.6. Grafo de Arabinosquinase 1 (ARA1).



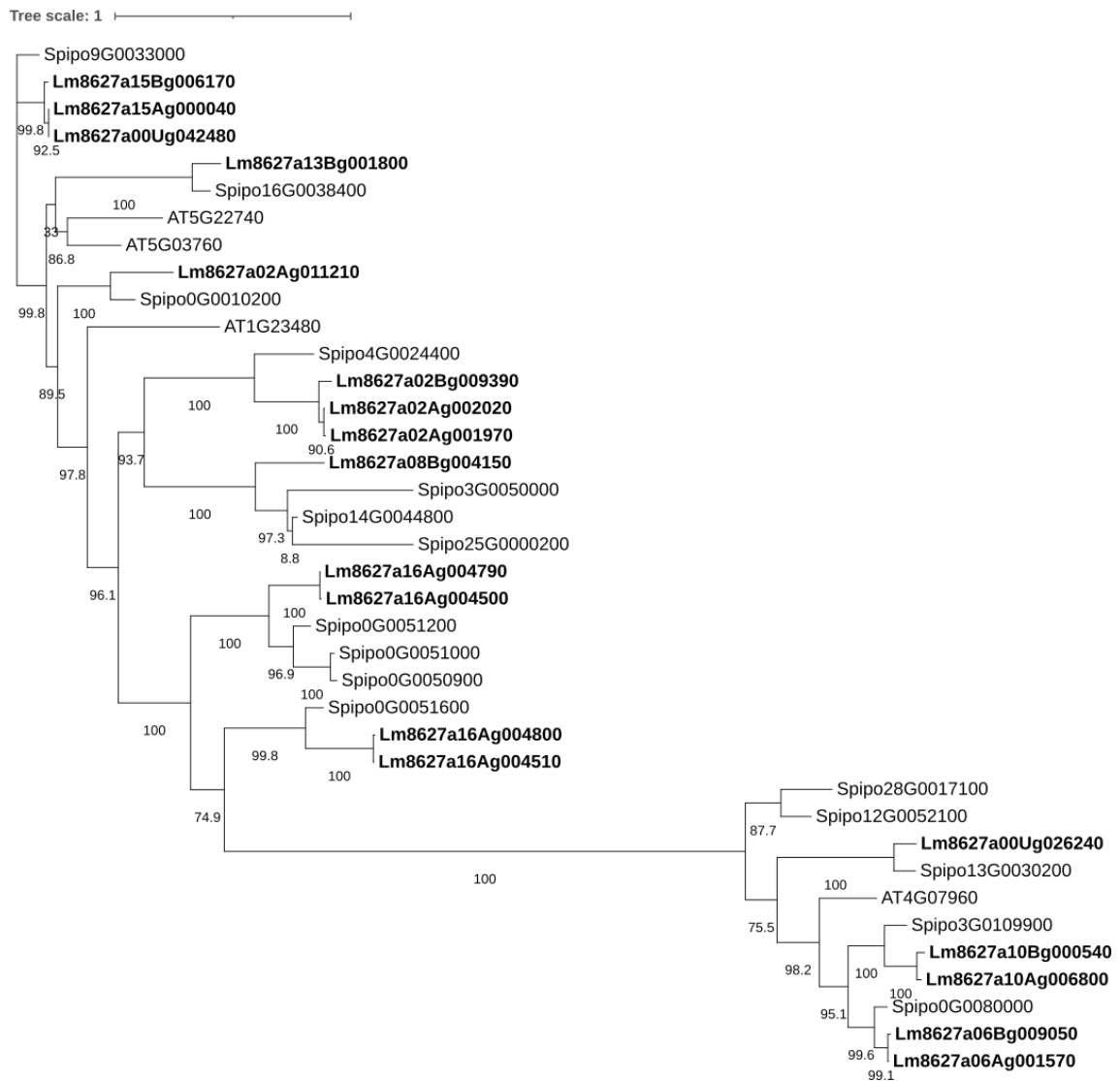
Apêndice 2.7. Grafo de Arabinofuranosidase (ASD).



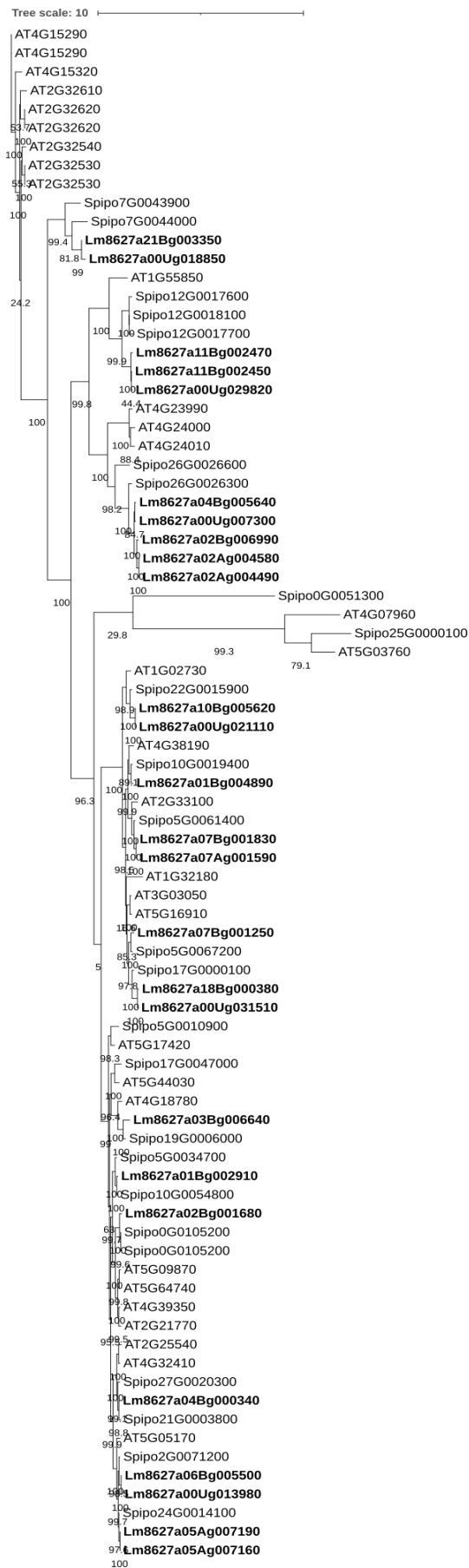
Apêndice 2.8. Grafo de UDP-apirose/UDP-xilose sintase (AXS).



Apêndice 2.9. Grafo de Glucomanano-4 β -manosiltransferase (CSLA).



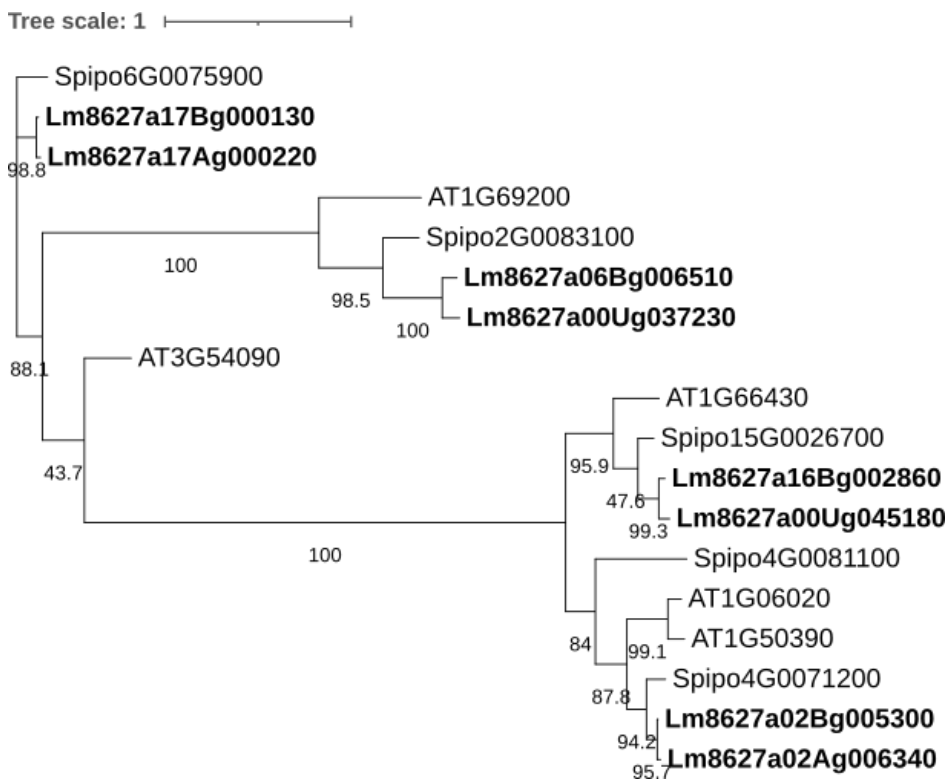
Apêndice 2.10. Grafo de Celulose sintase (CESA).



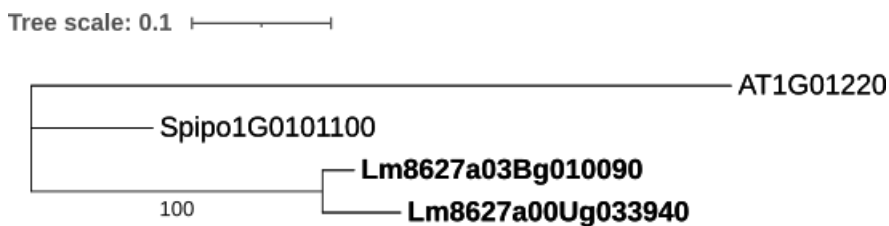
Apêndice 2.11. Grafo de 1,4- β -xilano sintase (CSLD5).



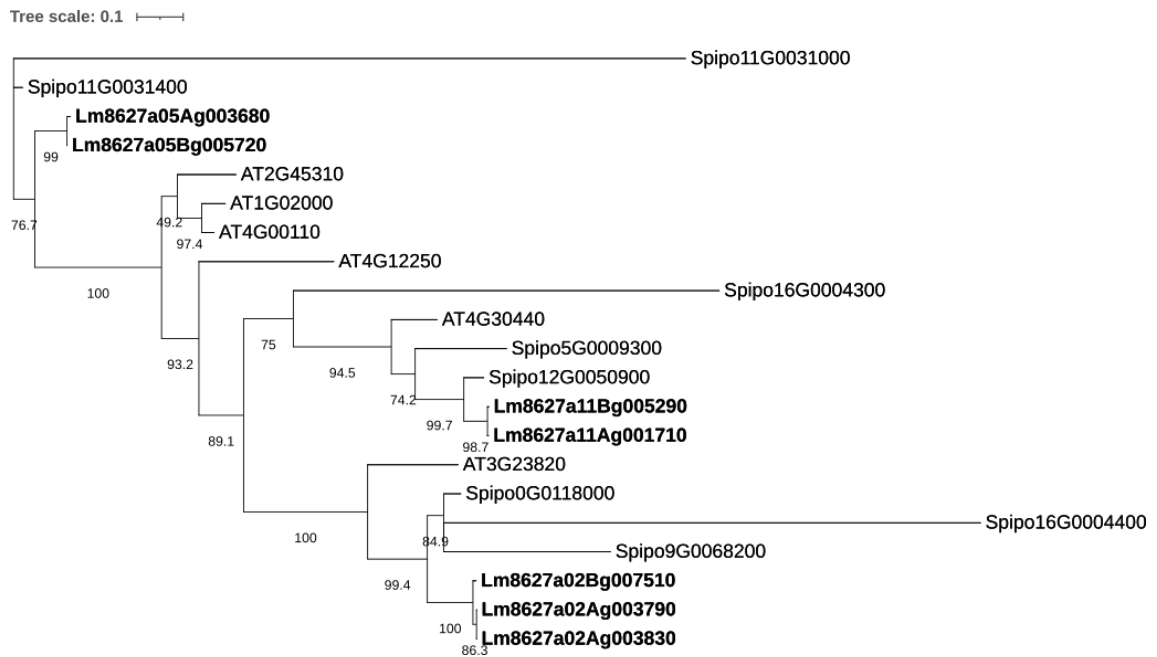
Apêndice 2.12. Grafo de frutoquinase (FK)



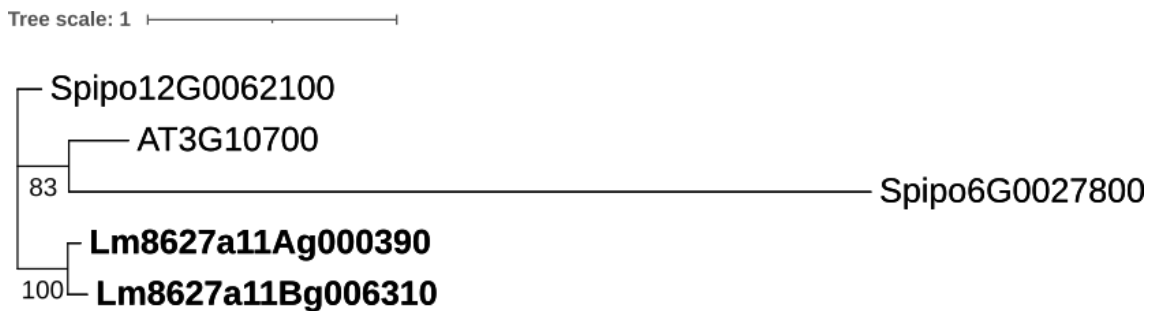
Apêndice 2.13. Grafo de Fucose-1P-guaniltransferase (FUC).



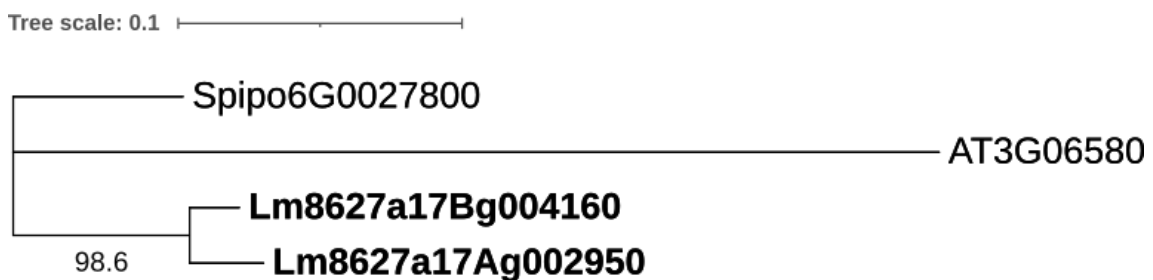
Apêndice 2.13. Grafo Glucuronato-4-epimerase (GAE).



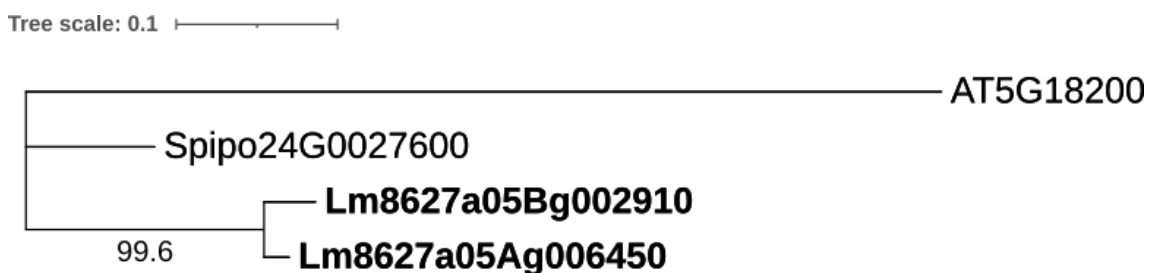
Apêndice 2.14. Grafo Galacturonoquinase (GALAK).



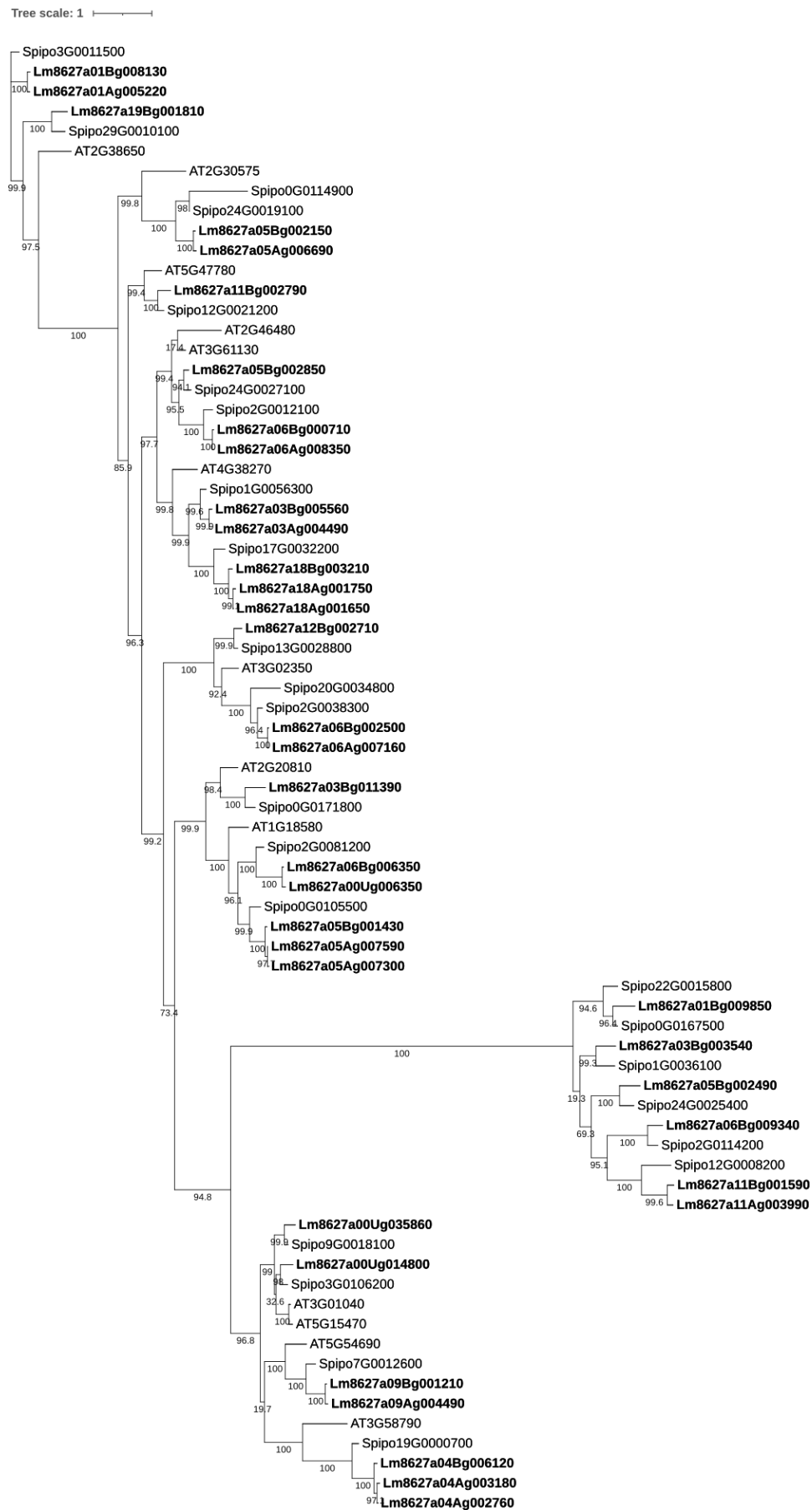
Apêndice 2.15. Grafo Galactoquinase (GALK).



Apêndice 2.16. Grafo UDP-galactose-1P-uridiltransferase (GALT).



Apêndice 2.17. Grafo α -1,4-galacturonosiltransferase (GAUT).



APÊNDICE C – referente ao material suplementar do Capítulo IV

Apêndice 4.1. Região codificante do gene AXS. Em vermelho está indicado o fragmento de 309 pb utilizado para obter a construção para o silenciamento do gene AXS. As sequências ressaltadas em amarelo correspondem aos oligonucleotídeos *foward* e *reverse* utilizados para amplificar o fragmento.

```

ATGGCGGCTTCCGGCGCGGCTGTTAGACTGGATCTGGATGGGCGACCGATCCAGCCCTTGACAATC
TGTATGATTGGGGCCGGGGTTTCATCGGCTCTCACCTCTGCGAGAAGCTCATGTTTGAGACCCAGC
ACACCGTCCTGGCTGTCGACGTCTACGATGATAAGATCCGTCATCTGCTAGAGCCGGAGAACGGTCA
CCCCTGGTCCTCCCGCATCCAGTTCACCGTCTCAACATCAAGCACGACTCCCGCCTCGAGGGCCTC
ATCAAGATGTCGGATCTGGTCATCAACTTGGCTGCGATCTGTACCCCGGCGGACTACAACACGCGCC
CGCTCGACACCATATACAGCAATTTTCATCGATGCACTCCCGGTGGTCAAATACTGCTCCGAGAGCAAC
AAGCGCCTCATCCACTTCTCTACATGTGAGGTTTACGGGAAGACAATCGGGTGCTTCCCTTCCCAAGGA
TCATCCCCTGAAAAAGGAGCCTGAGTTCTATATGCTTAAAGAAGATGAAACGCCCTGCATTTTTGGCC
CAATTGAGAAGCAAAGATGGTCTACGCATGTGCCAAGCAACTGATTGAGAGGCTCATATATGCCGA
GGCGCCCGAAAATGGCCTTCAGTTCTCAATTGTTAGGCCTTTCAACTGGATTGGACCGAGAATGGAC
TTTATTCCCGGGATTGATGGCCCAAGTGAGGGTGTTCGGAGAGTCTTGGCCTGCTTCAGCAATAACCT
TCTTCGCCATGAACCTTTGAAGCTTGTGGATGGTGGTCTTCCAGAGGACCTTTGTTTATATCAAGG
ACGCAATTGAAGCTGTCCACTTGATGATTGAAAACCGGAGAGAGCCAATGGCCACATTTTCAACGTC
GGAAATCCCAACAATGAGGTCACCTGTCAAGCAACTGGCTGAAATGATGACAAAGATTTACGCCAAGGT
CAGTGGAGAGCCCTCACTCGAGGTTCCCACTGTTGACGTGACCTCCAGGAATTCTACGGGGAAGG
CTACGATGATAGTGATAAGCGAATTCCTGACATGACCATCATCAACAGGCAGCTCGGTTGGGACCCG
AAGACATCACTCTGGGATTTGCTTGAGTCAACTCTGACGTACCAGCATAAGACGTATTCTGAAGCTAT
CAAACGGGCCACGGCAAAACCTGTTGCAACCAGCTAG

```

5' _____ Oligonucleotídeo senso → 3'

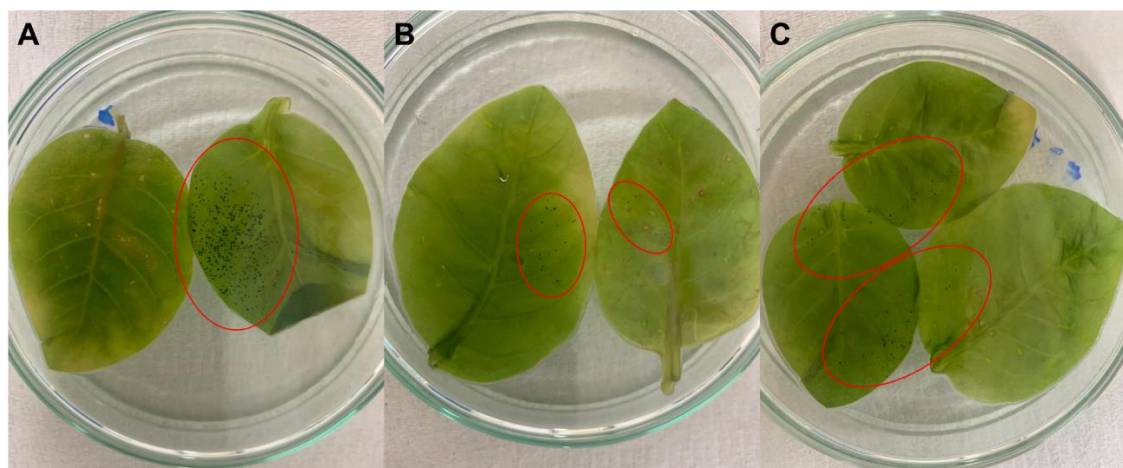
← 3' _____ Oligonucleotídeo antisenso 5'

309 nb.

Apêndice 4.2. Tabela de oligonucleotídeos.

Gene/iniciadores	Sigla	ID do gene	5'-Foward primer-3'	5'-Reverse primer-3'
Proteína fosfatase 2A	PP2A	Spipo9G0010500	GGACTATGTGGACCGTGGAT	ACCAGTGTGTGTCAGAAGGAAA
Subunidade pequena de rRNA metiltransferase NEP1	Lm18S		AGAGGAACAGTCGGGGCATT	CGGCATCGTTTACGGTTGAGA
UDP-glucuronato descarboxilase	UXS2	Spipo23G0021600	CTCTGCCGGAAGTCCTCTT	GTTGAACGTGGTGGAGAACA
	UXS4	Spipo22G0035200	TTGATGGCGAGAGGGGAGA	GGCAAGCGAGGTGGTAAAT
	UXS5	Spipo22G0035300	GCAAGCAACCGCTCACAGTC	CCTTCACAACCTCGGCAAGC
Manose 6P isomerase	MPI	Spipo8G0066600	CCGAAAGACCAGAGTTTGTCT	CCTGATCGTCAACGAGATTG
Fosfomanomutase	PMM	Spipo1G0035200	GGCTGGCAGTTTCTCATTTT	TCTCCCGTTCACTCCTTTG
Manose-1P guanililtransferase	MGP	Spipo23G0012100	TGGGCATCAAGATCACCT	GACGTCGCTGTTTATTACGA
GDP-fucose sintase	GER	Spipo12G0050600	ACCATTGTACGTCGCTTCC	TTTGAAGGGGATCTCGTCTG
Glucomanano-4 β -manosiltransferase	CSLA	Spipo0G0050900	ACGGCTTGTGATGTTCTCC	GGGTGAATGAGTGGATCGTT
Glicose 1P adenililtransferase	APL/ APS	Spipo28G0001400	CACAGAGAAACGGATGCAGA	CCTTTGGCTTCTCAGCAAAC
UDP-pirofosforilase	UGP	Spipo7G0027800	TTGCCGAGAAGAAGATCCAC	TTCTTACTGGGGCAAACCTC
Enzima ramificadora de 1,4- α -glucano	SBE	Spipo1G0057400	GAAGGTGGAGTGGGTTTTGA	GGCACGAGACGATTTCTTTC
Amido sintase	SS1	Spipo0G0050800	TCTGCAGCAACCAAGATGAC	GATCAACCCGAGGAATCTCA
	SS2	Spipo1G0057900	CAACTGGATGAAAGCTGCAA	AGGTGACTCTTCCGGCATAA
	SS3	Spipo26G0026900	GAAGTTCATCAAGGCCACTACC	CCCAGGTAAAGCGGTCAATA
Glucuronato-4-epimerase	GAE	Spipo11G0031000	TGTTACCAGAGTTGAAGACC	GATGTTCTTCTGGCCTTCA
UDP-apiose/UDP-xilose sintase	AXS_FULL	Spipo0G0011100	ATGGCGGCTTCGGCGCGG	CTAGCTGGTTGCAACAGGTTTTG
	AXS_Hairpin	Spipo0G0011101	CTGTCCACTTGTSTTTGAAAACC	TCTTATGCTGGTACGTCAGAGTTG
	SpAXS	Spipo0G0011102	ATGGCGGCTTCTGGCGC	TAGCAGATGACGGATCTTATCATCGTAGA
	AXS_qPCR	Spipo0G0011103	CGACTCCCGCCTCGAG	GGATGAGGCGCTTGTGCTC
	LmAXS	Lm8627a02Ag011070	GATGGACTTCATTCGGCGC	GCATGACAGCCTCGATGG
Resistência ao herbicida basta	Bar		TGCACCATCGTAACCACTA	ACAGCGACCACGCTCTTGAA
Resistência a canamicina	Kan		TGATATTCGGCAAGCAGGCA	GATGGATTGACGCGAGTTTC
	Kan2		TCAGAAGAAGCTCGTCAAGAAGC	TGAACAAGATGGATTGCACGC
Clonagem PCR8/GW/TOPO	M13		TGTAACACGACGGCCAG	CCAGGAAACAGCTATGAC
Promotor 35S	P35S		CAGTCTTACGGCGAGTTC	AATGCTGACCCACAGATGGTT
Terminador 35S	T35S		TGAGCGAAACCTATAAGAACC	GGCCATGCTAGTCCGCAA

Apêndice 4.3. Controle do processo bombardeamento de em tabaco. Letras A, B e C representam as réplicas empregadas do tabaco submetidas a dois tiros de bombardeamento com DNA carreando o material codificante do gene repórter de β -glucuronidase (GUS). Círculos vermelhos indicam regiões que apresentaram a positividade na incorporação do DNA de GUS.

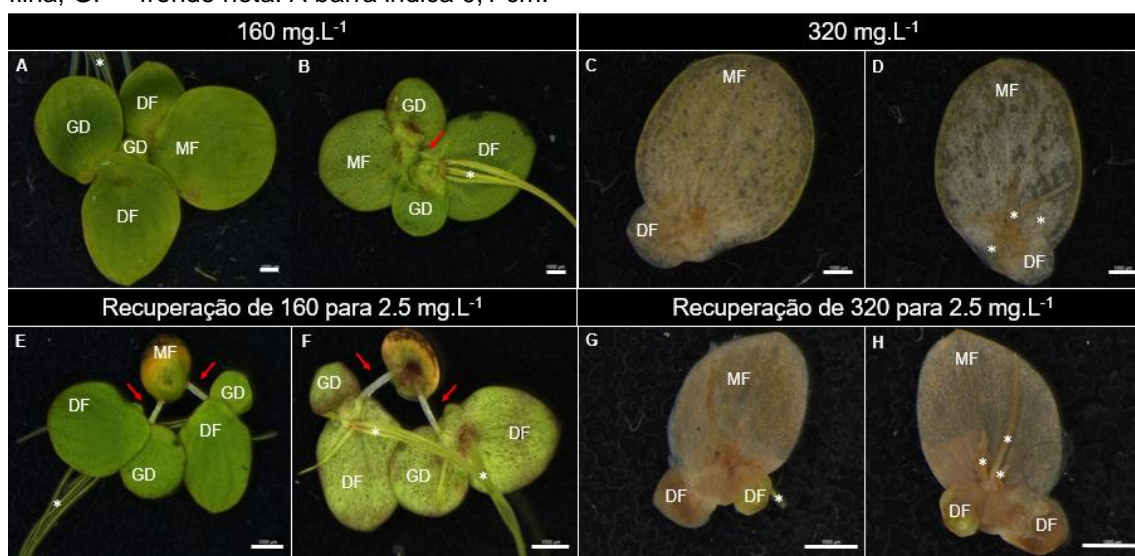


APÊNDICE D – referente ao material suplementar do Capítulo V

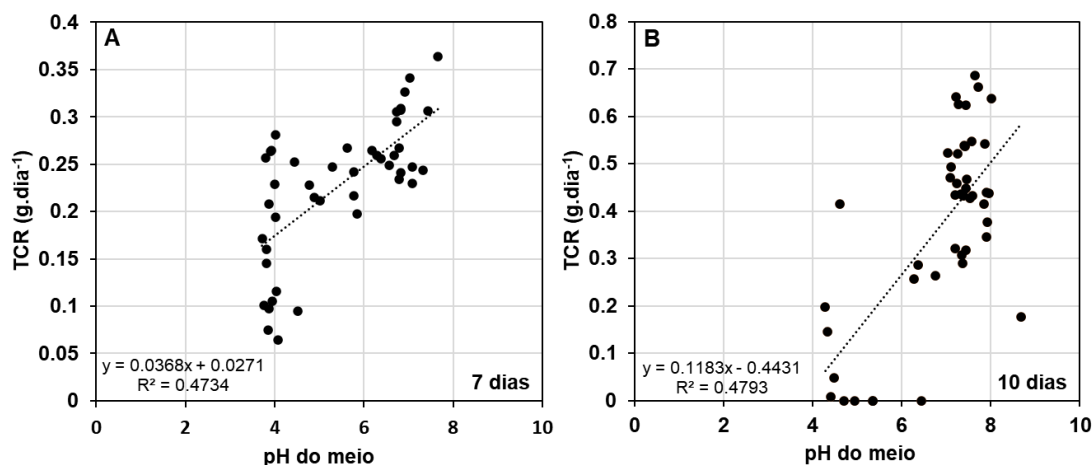
Apêndice 5.1. Sequência de oligonucleotídeos de *Spirodela polyrhiza* de genes envolvido na síntese ADP-glicose e UDP-glicose.

Name	Gene	Transcript	5'-Forward oligonucleotídeos-3'	5'-Reverse oligonucleotídeos-3'
<i>Elongation factor 1-α</i>	<i>EF1</i>	Spipo2G0041800	GGACCTGAAGAGAGGGTTCG	ACTTGACGGCGATGTGGG
<i>F-BOX Family protein</i>	<i>FBOX</i>	Spipo5G0021900	CCCACCAAGAACAGTCGCTT	TCAGATAATGCCCGCCGGTT
<i>UDP-glucose-4,6-dehydratase</i>	<i>RHM</i>	Spipo0G0113900	ACCCGGTCTTCCATAAATC	AGTTTCGATGGAGCAGAGGAA
<i>UDP-glucuronate decarboxylase</i>	<i>UXS</i>	Spipo23G0021600	CTCTGCCGGAAGTCTCTT	GTTGAACGTGGTGGAGAACA
<i>UDP-apiose/UDP-xylose synthase</i>	<i>AXS</i>	Spipo0G0011100	ATACAGCCCTCAAACCGCAA	TTCTACGGGGAAGGCTACGA
<i>Mannose-1P guanylyltransferase</i>	<i>MGP</i>	Spipo23G0012100	TGGGCATCAAGATCACCT	GACGTCGCTGTTTATTACGA
<i>Sucrose synthase</i>	<i>SUSY</i>	Spipo1G0051200	TCTGTGGAAACCAACGGATT	AACTTCTGGAAGGGGGTGT
<i>Starch synthase</i>	<i>SS</i>	Spipo1G0057900	CAACTGGATGAAAGCTGCAA	AGGTCAGCTCTTCGGCATAA
<i>α-1,4-galacturonosyl transferase</i>	<i>GAUT</i>	Spipo12G0021200	TTCTACCTCCCCGAGGTCTT	TCGTCCAAGAAGAGCACCTT

Apêndice 5.2. *Spirodela polyrhiza* recuperada da toxicidade do boro. As Figuras A e B representam plantas cultivadas em 160 mg.L⁻¹ de boro e C, e plantas D cultivadas em 3200 mg.L⁻¹ por 10 dias. As Figuras E, F, G e H foram plantas cultivadas em concentração ideal de boro (2,5 mg.L⁻¹) por 10 dias após a exposição ao alto teor de boro. As Figuras A, C, E e G mostram a vista adaxial das folhas de *Spirodela*. As Figuras B, D, F e H mostram as frondes da planta em vista abaxial. A seta vermelha mostra os estipes e (*) as raízes. MF = fronde mãe, DF = fronde filha, GF = fronde neta. A barra indica 0,1 cm.



Apêndice 5.3. Correlação entre crescimento relativo de *Spirodela polyrhiza* e pH do meio tratado com boro. A Figura A mostra a correlação entre o crescimento relativo e o pH das plantas após 7 dias de crescimento em 0-320 mg.L⁻¹ de boro. A Figura B mostra a correlação entre o crescimento relativo e o pH das plantas após 10 dias de crescimento em 0-320 mg.L⁻¹ de boro.



APÊNDICE E – divulgação científica durante o período de doutorado

Artigos publicados

PAGLIUSO, D. et al. High Saccharification, Low Lignin, and High Sustainability Potential Make Duckweeds Adequate as Bioenergy Feedstocks. **Bioenergy Research**, p. 1–11, 2 nov. 2020a.

PAGLIUSO, D. et al. Flavonoids from duckweeds: Potential applications in the human diet. **RSC Advances**, v. 10, n. 73, p. 44981–44988, 21 nov. 2020b.

PAGLIUSO, D. et al. The Effect of Sugarcane Straw Aging in the Field on Cell Wall Composition. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 819, 15 jul. 2021.

PAGLIUSO, D. et al. NDP-Sugar Pathways Overview of *Spirodela polyrhiza* and Their Relevance for Bioenergy and Biorefinery. **Bioenergy Research**, n. 0123456789, 2022a.

PAGLIUSO, D. et al. Duckweeds as Promising Food Feedstocks Globally. **Agronomy**, p. 1–25, 2022b.



High Saccharification, Low Lignin, and High Sustainability Potential Make Duckweeds Adequate as Bioenergy Feedstocks

Débora Pagliuso¹ & Adriana Grandis¹ & Eric Lam² & Marcos S. Buckeridge¹

Received: 28 July 2020 / Accepted: 16 October 2020 / Published online: 2 November 2020
 # Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Abstract

Duckweeds are the smallest free-floating aquatic monocots. They have a unique cell wall containing pectin polymers named apiogalacturonan and xylogalacturonan. Knowing that the cell wall composition is essential for duckweeds as a bioenergy feedstock, notably ethanol production, this work reports the five duckweed species' (*Spirodela polyrhiza*, *Landoltia punctata*, *Lemna gibba*, *Wolffiella caudata*, and *Wolffia borealis*) composition and saccharification potential. Nonstructural carbohydrates were, on average, 42% of the dry weight. The cell wall comprises 20.1% pectin and glucomannan, 35.2% hemicelluloses, 30% cellulose, and 5% lignin, and the fermentable sugars in duckweed walls are glucose, galactose, and xylose. Together, these monosaccharides constitute 51.4% of the cell wall. Duckweeds displayed low recalcitrance to hydrolysis, probably due to the low lignin and cellulose contents. Furthermore, the saccharification of the duckweeds was higher than sugarcane, a primary bioethanol feedstock. Results indicate that duckweed biomass displays a high potential as a feedstock for bioethanol production.

Keywords Cell wall · Polysaccharides · Ethanol · Fermentable sugars

Introduction

Carbon emissions from fossil fuels contribute to global warming, demanding sustainable energy resources [1]. One of the leading renewable fuel options is ethanol, produced from various feedstocks [2, 3]. The first-generation (1G) ethanol is produced from starch or sucrose, whereas the second-generation (2G) ethanol is produced from biomass. Sugarcane (*Saccharum* sp.), sugar beet (*Beta vulgaris*), and maize (*Zea mays*) are by far the most employed for 1G production [3]. Each crop has its features and production capacity technologies. For Brazil, sugarcane is essential, since it is the largest producer and ethanol is the second worldwide producer with 30.3 billion/liters/year [4].

On the other hand, the lignocellulosic material used for 2G is divided into agro-industrial residues (for example, sugarcane bagasse and straw, corn stover, rice straw, wheat straw, cassava pulp, and palm residues), as well as eucalyptus, fast-growing legume trees (e.g., *Leucaena*), fast-growing grasses (e.g., elephant grass - *Pennisetum purpureum*, switchgrass - *Panicum virgatum*, poplar, willow, and *Miscanthus*), and some other crops as alfalfa, hemp, soybean, and water hyacinth [5]. However, the characteristics of the lignocellulosic material and the demand for cultivation areas are still problematic. One barrier for the 2G ethanol production is the recalcitrance, that limits cell wall cell wall polymers hydrolysis. Biomass requires a pretreatment to disrupt cell walls and access fermentable sugars for conversion [6]. The crop recalcitrance stems from the cell wall polymer (cellulose, hemicellulose, pectin, and lignin) features and interactions [5, 7, 8]. It is known that pectin structure and assembly could negatively impact the biomass saccharification due to the lack of fermentable sugars [9]. High hemicellulose levels prevent biomass saccharification due to polymers interlinking [7], especially arabinoxylans and xyloglucans, and their interaction with cellulose [8]. Moreover, cellulose microfibrils' crystallinity can be a limiting factor for cellulases penetration into biomass [7]. Thus, understanding cell wall composition and structure tends to allow more cost-effective approaches to bioethanol production.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s12155-020-10211-x>.

* Marcos S. Buckeridge
 msbuck@usp.br

¹ Laboratory of Plant Physiological Ecology, Institute of Biosciences, Department of Botany, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

² Department of Plant Biology and Pathology, Rutgers, The State University of New Jersey, New Brunswick, NJ, USA

Cite this: *RSC Adv.*, 2020, 10, 44981

Flavonoids from duckweeds: potential applications in the human diet†

 Débora Pagliuso,^a Carmen Eusebia Palacios Jara,^{ab} Adriana Grandis,^a Eric Lam,^c Marcelo José Pena Ferreira^b and Marcos Silveira Buckeridge^{*,a}

Duckweeds are the smallest free-floating flowering aquatic plants. Their biotechnological applications include their use as food, bioenergy, and environmental sustainability, as they can help clean polluted water. The high growth capacity and their chemical properties make them suitable for human health applications. Here we evaluated the ethanolic extracts from five species of duckweeds by HPLC-DAD/MS-MS for chemical characterization. Sixteen compounds were identified and quantified, in which three were chlorogenic acid derivatives and eleven apigenin and luteolin derivatives. We describe for the first time the presence in duckweeds of 5-*O*-(*E*)-caffeoylquinic acid (1), 3-*O*-(*E*)-coumaroylquinic acid (2), luteolin-7-*O*-glucoside-*C*-glucoside (3), 4-*O*-(*E*)-coumaroylquinic acid (4), luteolin-6-*C*-glucoside-8-*C*-rhamnoside (5), and luteolin-8-*C*-glucoside-6-*C*-rhamnoside (6). The flavonoids diversity showed a significant content of luteolin and its derivatives, except for *Landoltia punctata* that had significant apigenin content. Flavones identified in duckweeds were mostly *C*-glycosides, which can benefit human diets, and its abundance seems to be related to the higher antioxidant and anticancer capacities of *Wolffiella caudata*, *Wolffia borealis*, and *Landoltia punctata*. Our findings reinforce the idea that duckweeds could be valuable additives to the human diet, and their potential should be further explored.

Received 4th August 2020
Accepted 21st November 2020

DOI: 10.1039/d0ra06741e

rsc.li/rsc-advances

Introduction

Duckweed is the given name for the smallest flowering aquatic plants that belong to Lemnaceae, which comprises 36 species grouped in five genera: *Landoltia*, *Lemna*, *Spirodela*, *Wolffia*, and *Wolffiella*.^{1,2} Furthermore, these plants are subdivided into the subfamilies Lemnoideae and Wolffioideae, which contain respectively the species of *Landoltia*, *Lemna* and *Spirodela*, and the rootless species of *Wolffia* and *Wolffiella*.³ These plants are capable of duplicating their biomass in 96 hours, conferring enormous applicability in biotechnology as water remediators, for environmental monitoring, food, biofuels, and cosmetic production as well as pharmaceutical intakes.^{4–10} The evolution trend in Lemnaceae has a relationship with secondary metabolites and cell wall composition despite its diversity.^{11,12}

In plants, the secondary metabolites consist of a broad group of compounds produced to benefit the organism for different purposes: those related to the internal functioning of the plant and others selected by their applications for human health.^{13,14}

Among the secondary metabolites, the flavonoids are a group of compounds synthesized from cinnamic acid derivatives coupled with three acetate units that display several biological roles.¹⁵ These polyphenol compounds are characterized by the C₁₅ skeleton arranged in two phenyl rings and a heterocyclic ring (C₆–C₃–C₆). The substitution pattern of the central ring along with the degree of unsaturation and the oxidation of the flavonoid structure resolve this group of compounds into six main classes: flavonol, flavone, flavanonol, flavanone, anthocyanin, and isoflavonoid.^{14,16,17} Despite their grossly similar chemical properties, the flavonoids in plants are involved in diverse processes such as growth, photosynthesis, and protective biological systems such as seed development, pollination, light screening, defence against pathogens, protection against UV-damage, temperature acclimation, and drought resistance. Also, some flavonoids can act as signaling molecules for allelopathic interactions, such as phytoalexins and detoxifying agents.^{13,14}

Besides the natural bioactive properties in plants, flavonoids are phytochemicals with several medically-relevant biological activities such as antiviral, antifungal, antibacterial anti-hepatotoxic, anti-osteoporotic, antiulcer, anti-proliferative.^{16,18–21} Flavonoids display several other properties such as immunomodulation, apoptotic effects, and consolidation of applications on carcinogenesis, inflammation, atherosclerosis, and thrombosis.^{16,18,19} Flavonoids are also considered functional foods that benefit human health.^{16,18,19} Considering the applications for human food, the antioxidant capacity of

^aLaboratory of Plant Physiological Ecology, Department of Botany, Institute of Biosciences, University of São Paulo, Brazil

^bLaboratory of Phytochemistry, Department of Botany, Institute of Biosciences, University of São Paulo, Brazil

^cDepartment of Plant Biology and Pathology, Rutgers, The State University of New Jersey, New Brunswick, New Jersey, USA. E-mail: msbuck@usp.br

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/d0ra06741e





The Effect of Sugarcane Straw Aging in the Field on Cell Wall Composition

Débora Pagliuso^{1†}, Adriana Grandis^{1†}, Cristiane Ribeiro de Sousa¹,
Amanda Pereira de Souza², Carlos Driemeier³ and Marcos S. Buckeridge^{1*}

¹Laboratory of Plant Physiological Ecology, Department of Botany, Institute of Biosciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ²Carl R. Woese Institute for Genomic Biology, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL, United States, ³Brazilian Biorenewables National Laboratory, Brazilian Center for Research in Energy and Materials, Campinas, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Jenny C. Mortimer,
University of Adelaide, Australia

Reviewed by:

John Paul Moore,
Stellenbosch University, South Africa
Kanwarpal Singh Dhugga,
Consultative Group on International
Agricultural Research (CGIAR),
United States

*Correspondence:

Marcos S. Buckeridge
msbuck@usp.br

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Plant Biotechnology,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 11 January 2021

Accepted: 12 April 2021

Published: 15 July 2021

Citation:

Pagliuso D, Grandis A,
de Sousa CR, de Souza AP,
Driemeier C and Buckeridge MS
(2021) The Effect of Sugarcane Straw
Aging in the Field on Cell Wall
Composition.
Front. Plant Sci. 12:652168.
doi:10.3389/fpls.2021.652168

Cellulosic ethanol is an alternative for increasing the amount of bioethanol production in the world. In Brazil, sugarcane leads the bioethanol production, and to improve its yield, besides bagasse, sugarcane straw is a possible feedstock. However, the process that leads to cell wall disassembly under field conditions is unknown, and understanding how this happens can improve sugarcane biorefinery and soil quality. In the present work, we aimed at studying how sugarcane straw is degraded in the field after 3, 6, 9, and 12 months. Non-structural and structural carbohydrates, lignin content, ash, and cellulose crystallinity were analyzed. The cell wall composition was determined by cell wall fractionation and determination of monosaccharide composition. Non-structural carbohydrates degraded quickly during the first 3 months in the field. Pectins and lignin remained in the plant waste for up to 12 months, while the hemicelluloses and cellulose decreased 7.4 and 12.4%, respectively. Changes in monosaccharide compositions indicated solubilization of arabinoxylan (xylose and arabinose) and β -glucans (β -1,3 1,4 glucan; after 3 months) followed by degradation of cellulose (after 6 months). Despite cellulose reduction, the xylose:glucose ratio increased, suggesting that glucose is consumed faster than xylose. The degradation and solubilization of the cell wall polysaccharides concomitantly increased the level of compounds related to recalcitrance, which led to a reduction in saccharification and an increase in minerals and ash contents. Cellulose crystallinity changed little, with evidence of silica at the latter stages, indicating mineralization of the material. Our data suggest that for better soil mineralization, sugarcane straw must stay in the field for over 1 year. Alternatively, for bioenergy purposes, straw should be used in less than 3 months.

Keywords: sugarcane straw, cell wall, decomposition, recalcitrance, polysaccharide

INTRODUCTION

New energy resources for a sustainable environment and reduction of oil use has been growing. Among the diverse feedstocks, sugarcane has enormous potential for bioethanol and bioelectricity production. Concerning bioethanol, both first-generation (1G) and second-generation (2G) can be employed using sucrose and biomass from sugarcane, respectively, (de Souza et al., 2014). Brazil is the largest sugarcane producer globally, being responsible for 40% of global production (Cherubin et al., 2019; Ullah et al., 2020). Sugarcane in Brazil has been economically important since the 16th



NDP-Sugar Pathways Overview of *Spirodela polyrhiza* and Their Relevance for Bioenergy and Biorefinery

Débora Pagliuso¹ · Bruno Viana Navarro¹ · Adriana Grandis¹ · Marcelo M. Zerillo² · Eric Lam³ · Marcos Silveira Buckeridge¹

Received: 2 August 2021 / Accepted: 26 October 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

Abstract

Duckweeds are fast-growing aquatic plants suitable for bioenergy due to fermentable-rich biomass with low lignin and unique cell wall. The plant cell wall is built from pathways of nucleotide sugar genes that culminate in cell wall synthesis and deposition. Therefore, understanding these pathways by mapping the genes involved and their expression would be necessary for developing tools to improve bioenergy production. In this work, the genes associated with the NDP-sugar pathway (*de novo* and *salvage*) were mapped and correlated to the chemical characterization of the giant duckweed (*Spirodela polyrhiza*) cell wall. This plant biomass has been characterized as having 3% starch, 49% soluble sugars, 40% cell wall, and 8% non-measured compounds. The cell walls are synthesized by the NDP-sugar pathway and represent a significant carbon sink. This sink results from the action of proteins encoded by 190 orthologs of the 38 targets of the NDP-sugar pathway, of which 49 are starch and sucrose-related, 54 pectins-related, 65 hemicellulose-related, and 23 cellulose-related. Chemical analysis of the cell wall revealed 49% pectins, 23% hemicellulose, and 10% cellulose. These carbohydrates can potentially provide biorefinery as adjuvants, cosmetics, food additives, stabilizers, gelling agents, and principally as biofuels.

Keywords Duckweed · Cell wall · Polysaccharides · Biofuels · Carbohydrate synthesis

Introduction

After the carbon is assimilated through photosynthesis, it is stored as soluble sugars (e.g., sucrose), starch, and cell walls through a series of metabolic transformations. Carbon can be stored in different forms and proportions depending on the species and the tissue. However, in most cases, plant tissues will accumulate the majority of the carbon as cell walls. Thus, most of the energy stored as chemical bonds within biomass is found in the plant cell walls. As a result, a deep understanding of carbon metabolism will be necessary to control the distribution of compounds that hold bioenergy

in the form of carbohydrates (the primary polymers in plant cell walls).

Plant cells are surrounded by an encoded polymeric structure composed of polysaccharides (pectins, hemicellulose, and cellulose), proteins, and phenolic compounds. This composite confers physical, chemical, and mechanical protection throughout plant growth and development [1, 2]. Cell wall polysaccharides are organized as a core of cellulose microfibrils, surrounded by hemicellulose and phenolic compounds, and immersed in a pectin matrix [2]. The cellulose microfibrils are formed by 1,4- β -glucan chains and represent 40% of the cell wall composition in terrestrial plants [3]. The polysaccharides attached to the cellulose surface represent 30% of the cell wall. They are hemicelluloses, a class of 1,4-linked backbone polymers including xyloglucans, heteroxylans, and heteromannans [3]. The pectins are the most complex polymers, composed mainly of galacturonic acids (70%), which are linked at O-1 and O-4 to form homogalacturonans, rhamnogalacturonans, xylogalacturonans, and apioagalacturonans [4]. Plant cell wall is generally conserved among species, despite slight modifications depending on the tissues [1]. Nevertheless, it has been recently found that

✉ Marcos Silveira Buckeridge
msbuck@usp.br

¹ Laboratory of Plant Physiological Ecology, Department of Botany, Institute of Biosciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

² GaTE Lab, Department of Botany, Institute of Biosciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

³ Department of Plant Biology and Pathology, Rutgers, The State University of New Jersey, New Brunswick, NJ, USA

Article

Duckweeds as Promising Food Feedstocks Globally

Débora Pagliuso ¹, Adriana Grandis ¹, Janaina Silva Fortirer ¹, Plinio Camargo ², Eny Ioshevet Segal Floh ³
and Marcos Silveira Buckeridge ^{1,*}

¹ Laboratory of Plant Physiological Ecology, Department of Botany, Institute of Biosciences, University of São Paulo, São Paulo 05508-090, Brazil; deborapagliuso@usp.br (D.P.); agrandis@usp.br (A.G.); janainawx@gmail.com (J.S.F.)

² Centro de Energia Nuclear na Agricultura, University of São Paulo, Piracicaba 13416-000, Brazil; pliniobarbosadecamargo@gmail.com

³ Plant Cell Biology Laboratory, Department of Botany, Institute of Biosciences, University of São Paulo, São Paulo 05508-090, Brazil; enyfloh@usp.br

* Correspondence: msbuck@usp.br

Abstract: Duckweeds are the smallest flowering plants on Earth. They grow fast on water's surface and produce large amounts of biomass. Further, duckweeds display high adaptability, and species are found around the globe growing under different environmental conditions. In this work, we report the composition of 21 ecotypes of fourteen species of duckweeds belonging to the two subfamilies of the group (Lemnoideae and Wolffioideae). It is reported the presence of starch and the composition of soluble sugars, cell walls, amino acids, phenolics, and tannins. These data were combined with literature data recovered from 85 publications to produce a compiled analysis that affords the examination of duckweeds as possible food sources for human consumption. We compare duckweeds compositions with some of the most common food sources and conclude that duckweed, which is already in use as food in Asia, can be an interesting food source anywhere in the world.

Keywords: duckweed; meal; Lemnoideae; Wolffioideae; aquaculture; carbohydrates; and protein



Citation: Pagliuso, D.; Grandis, A.; Fortirer, J.S.; Camargo, P.; Floh, E.I.S.; Buckeridge, M.S. Duckweeds as Promising Food Feedstocks Globally. *Agronomy* **2022**, *12*, 796. <https://doi.org/10.3390/agronomy12040796>

Academic Editor: Marten Sørensen

Received: 1 January 2022

Accepted: 17 February 2022

Published: 26 March 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Human growth is estimated to reach over 9 billion by 2050 [1], imposing anthropogenic pressure on our food system. This population growth, along with climate change and resource depletion, demands the development of a sustainable food system to secure nutritious food for future generations [2–4]. The International Assessment of Agricultural Knowledge, Science, and Technology for Development (IAASTD) highlights that current food systems increase intake of fats, meats, sugar, and salt, with a consumption reduction of fruits and vegetables [5], which is reflected in human health. New agendas and policies are modifying concepts in food production to increase food safety to ensure animal, plant, and human health [1,5]. The 17 Sustainable Development Goals (SDGs) adopted by the United Nations in 2015 are expected to impact each food system framework [6]. The pandemic of COVID-19 highlighted the importance of the SDG 2 goal (zero hunger) once malnutrition and food insecurity became a growing concern worldwide. The slowdown of the economy and the lockdowns adopted in different world regions disrupted the food supply chain, with loss of income and livelihoods, widening inequality, disrupting social protection programs, and altering food environments. These consequences are correlated with uneven food prices in localized contexts [7]. Therefore, improving the food system must help reduce climate change impacts, increase environmental efficiency, and increase the social and economic viability [2,3].

One of the biggest concerns regarding food production is the increase of urbanization and reducing land use for agriculture. In this way, aquaculture has emerged as a promising global food system [8], and duckweeds are a group of plants that can improve agriculture due to their lower impact on land use. Duckweeds are miniature aquatic plants that display

Resumos em congressos

PAGLIUSO, D.; NAVARRO, B.N; GRANDIS, A. ZERILLO, M.M.; LAM, E.; BUCKERIDGE, M.S. Nucleotide-sugar pathway in the giant duckweed and its involvement in cell wall applications, In: The 7th International Conference on Plant Cell Wall Biology. Sapporo, Japão (evento online), 7 de Junho-01 de Julho de 2021.