

AMANDA FANELLI DE SOUZA

Análise filogenética e caracterização funcional de genes BAHD de cana-de-açúcar potencialmente envolvidos com a incorporação de ácidos hidroxicinâmicos na parede celular

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de concentração de Conversão de Biomassa

Orientador: Dr. Elisson Antonio da Costa Romanel

Versão Original

Lorena

2019

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Souza, Amanda Fanelli de

Análise filogenética e caracterização funcional de genes BAH1 de cana-de-açúcar potencialmente envolvidos com a incorporação de ácidos hidroxicinâmicos na parede celular / Amanda Fanelli de Souza; orientador Elisson Antonio da Costa Romanel - Versão Original. - Lorena, 2019.
146 p.

Tese (Doutorado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2019

1. Cana-de-açúcar. 2. Ácidos hidroxicinâmicos. 3. Bahd. I. Título. II. Romanel, Elisson Antonio da Costa, orient.

RESUMO

SOUZA, A.F. **Análise filogenética e caracterização funcional de genes BAHD de cana-de-açúcar potencialmente envolvidos com a incorporação de ácidos hidroxicinâmicos na parede celular.** 2019. 146 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

O uso eficiente da biomassa lignocelulósica de cana-de-açúcar em biorefinarias é um desafio dada a baixa digestibilidade desses materiais. Em gramíneas, o conteúdo dos ácidos hidroxicinâmicos é um dos fatores que contribui para a recalcitrância da parede celular. Genes da superfamília BAHD envolvidos na adição dos ácidos hidroxicinâmicos ferúlico (FA) e *p*-cumárico (*pCA*) (subclado de Mitchell) foram caracterizados funcionalmente em gramíneas, e têm potencial de aplicação no aumento da digestibilidade da parede celular. Dessa forma, os objetivos desse trabalho foram a identificação dos genes da família BAHD em cana-de-açúcar, identificação de genes candidatos com potencial função relacionada à incorporação de ácidos hidroxicinâmicos e caracterização funcional dos genes selecionados com potencial biotecnológico *ScAt10* e *ScAt4*. Utilizando métodos de bioinformática foi feita uma análise filogenética da família BAHD em gramíneas. Usando bancos de ESTs e RNA-Seq de cana-de-açúcar, foram identificados transcritos pertencentes à família BAHD e a análise *in silico* do padrão de expressão dos genes do clado de Mitchell deu suporte ao provável papel de alguns genes. A análise de expressão dos genes do clado de Mitchell ao longo do desenvolvimento do colmo de híbridos de cana-de-açúcar (H89 e H321) por RT-qPCR, revelou que de uma forma geral esses genes foram mais expressos no entrenó mais jovem. Os genes *ScAt10* e *ScAt4* foram inseridos em vetores de super-expressão (*pzp221b:Ox*) e silenciamento por *RNAi* (*pzp221b:RNAi*), os quais foram transformados na gramínea modelo milho (*Zea mays*). As linhagens de superexpressão *Ox:ScAt10* apresentaram um aumento muito significativo (~170 vezes) no teor de *pCA*, especificamente na hemicelulose, e redução no teor de FA (~10x). Ademais, pelo menos um evento de silenciamento *ScAt4:RNAi* apresentou diminuição de ~3x de *pCA* especificamente na lignina, porém nas linhagens de super-expressão *Ox:ScAt4* não foram detectadas alterações no conteúdo de *pCA/FA* da parede celular. Os resultados sugerem que *ScAt10* possui atividade relacionada à incorporação de *pCA* na hemicelulose, que pode ser explorada para aumento da digestibilidade.

Palavras chave: Cana-de-açúcar. Ácidos Hidroxicinâmicos. BAHD

ABSTRACT

SOUZA. A.F. **Phylogenetic analysis and functional characterization of sugarcane BAHD genes potentially involved with hydroxycinnamic acid incorporation into cell wall**. 2019. 146 p. Thesis (Doctoral of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

The efficient use of sugarcane lignocellulosic biomass is challenging, especially due to the low digestibility of these materials. In grasses, hydroxycinnamic acids content is one of several factors that contributes to cell recalcitrance. BAHD family genes involved in ferulic acid (FA) and p-coumaric acid (*pCA*) incorporation (Mitchell's subclade) have already been identified and functionally characterized in many grasses and have potential to increase cell wall digestibility. In this sense, the goals of this work were the identification of BAHD genes in sugarcane, identification of candidate genes putatively involved with hydroxycinnamic acid incorporation and functional characterization of selected genes *ScAt10* and *ScAt4*, with potential in biotechnological applications. Using bioinformatics approaches, we performed a phylogenetic analysis of BAHD in grasses. Using ESTs and RNA-seq data, sugarcane transcripts belonging to BAHD family were identified, and also *in silico* expression analysis of Mitchell's clade genes supported their predicted role in many cases. Expression analysis of Mitchell's clade genes using RT-qPCR throughout culm development of sugarcane hybrids (H89 and H321) showed a higher expression in the youngest internode. *ScAt10* and *ScAt4* were cloned into overexpression (*pzp221b:Ox*) and RNAi silencing (*pzp221b:RNAi*), which were transformed into model grass maize (*Zea mays*). Transgenic overexpression lines (*Ox:ScAt10*) showed a very significant increase (~170x, $p < 0.001$) in *pCA* content, specifically bound to hemicellulose. In addition, at least one silencing event *ScAt4:RNAi* showed ~3x decrease in *pCA* content, specifically attached to lignin. However, lines overexpressing *ScAt4* did not show significant differences in *pCA* content. This work data suggests that *ScAt10* has activity related with incorporation of *pCA* into hemicellulose, which could be explored for biotechnological applications to increase cell wall digestibility.

Keywords: Sugarcane. Hydroxycinnamic Acid. BAHD