



Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Biologia

Nery Tirabante Terrones

Papel do gene *ScTpx2-like* na tolerância ao déficit hídrico na cana de açúcar

Role of the *ScTpx2-like* gene in water deficit tolerance in sugarcane

Campinas-SP

2022

Nery Tirabante Terrones

Papel do gene *ScTpx2-like* na tolerância ao déficit hídrico na cana de açúcar

Role of the *ScTpx2-like* gene in water deficit tolerance in sugarcane

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestra em Genética e Biologia Molecular na área de Genética Vegetal e Melhoramento.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA NERY
TIRABANTE TERRONES E ORIENTADA
PELO MARCELO MENOSSO TEIXEIRA

Campinas

2022

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

T511p Tirabante Terrones, Nery, 1988-
Papel do gene *ScTpx2-like* na tolerância ao déficit hídrico na cana-de-açúcar / Nery Tirabante Terrones. — Campinas, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Marcelo Menossi Teixeira.
Dissertação (mestrado) — Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Cana-de-açúcar. 2. Plantas transgênicas. 3. Desidratação. 4. Prolina. 5. Malondialdeído. 6. Seca. I. Menossi, Marcelo, 1968-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Role of *ScTpx2-like* gene in water deficit tolerance in sugarcane

Palavras-chave em inglês:

Sugarcane

Transgenic plants

Dehydration

Proline

Malondialdehyde

Drought

Área de concentração: Genética Vegetal e Melhoramento

Titulação: Mestra em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Marcelo Menossi Teixeira [Orientador]

Helaine Carrer

Jorge Mauricio Costa Mondego

Data de defesa: 11-03-2022

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-0634-1522>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7866667206523701>

Campinas, 11 de março, 2022

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira

Prof. Dra. Helaine Carrer

Prof. Dr. Jorge Mauricio Costa Mondego

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia.

DEDICATÓRIA

A Deus, por ter me permitido chegar a este ponto e me dado saúde para alcançar meus objetivos, além de sua infinita bondade e amor.

Para minha mãe Liboria, por ter me apoiado em todos os momentos, por seus conselhos, valores e seu amor.

Para meu pai Vicente, pelos exemplos de perseverança que o caracterizam e pelo seu amor.

À minha irmã Olga, pelo apoio mutuo nos momentos bons e difíceis que enfrentamos juntas.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador professor Dr. Marcelo Menossi Teixeira pela oportunidade de trabalhar e desenvolver o projeto de pesquisa no seu laboratório, pela paciência e orientação nos momentos que mais necessitei.

Aos técnicos do laboratório, Pedro Araújo e Wilson que facilitam muito nossa rotina de trabalho do nosso dia a dia.

A toda a equipe do laboratório, especialmente José Sérgio, William De Souza, Lucia Mattiello, Daniel Neris, Nicholas Zani, Camila Barboza, Maria Fernanda e Juan Pablo que sempre foram comigo amáveis para me orientar em momentos quando mais precisei de ajuda.

A equipe da Pangeia Biotech, especialmente o Paulo De Lucca e a Juliana pela colaboração e orientações durante o desenvolvimento do projeto.

A Unicamp e o Instituto de Biologia pela infraestrutura, a pós-graduação pelos serviços.

A CAPES pela bolsa de estudo e fazer possível a realização deste projeto

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

RESUMO

A cana-de-açúcar tem um papel muito importante na economia brasileira e um dos principais fatores ambientais que limitam a produtividade é a seca. O gene *ScTpx2-like* que é induzido pela seca em cana de açúcar sob condições de campo e sua superexpressão confere aumento da tolerância ao déficit hídrico em *Arabidopsis*. O objetivo deste projeto foi avaliar o impacto de níveis aumentados de expressão de *ScTpx2-like* em plantas transgênicas de cana submetidas a déficit hídrico. Para tanto, foram produzidas plantas superexpressando o gene sob controle do promotor *pUbi-1* de milho. As plantas de cana de açúcar, transgênicas e selvagens, foram submetidas ao déficit hídrico durante 10 dias a uma capacidade de vaso de 30%. As plantas que superexpressam o gene *ScTpx2-like* apresentaram eficiência de 12- 23% maior do que as selvagem na taxa fotossintética. O conteúdo de prolina após os 10 dias de déficit hídrico teve um aumento de 48% em plantas selvagens e de 50 a 72% nas plantas transgênicas. O teor de malondialdeído (MDA) aumentou 129% nas plantas selvagens e também nas plantas que superexpressam o gene *ScTpx2-like*, embora nestas, os níveis de MDA foram menores que os observados nas plantas selvagens, variando entre 20 e 107% nos diferentes eventos. Nossos dados indicam que a superexpressão do gene *ScTpx2-like* reduz os efeitos do déficit hídrico em cana de açúcar, abrindo perspectivas para aplicações biotecnológicas no desenvolvimento de novos cultivares comerciais tolerantes à seca.

Palavras chave: Cana de açúcar, *Tpx2-like*, Déficit hídrico, Prolina, MDA, seca

ABSTRACT

Sugarcane plays a very important role in the Brazilian economy and drought is one of the main environmental factors limiting its productivity. The *ScTpx2-like* gene is induced by drought in sugarcane under field conditions and its overexpression confers increased tolerance to water deficit in *Arabidopsis*. The aim of this project was to evaluate the impact of increased levels of *ScTpx2-like* expression in transgenic sugarcane plants subjected to water deficit. For this purpose, plants overexpressing the gene under the control of the maize *pUbi-1* promoter were produced. The transgenic and wild sugarcane plants were subjected to water deficit for 10 days at a field capacity of 30%. Plants overexpressing the *ScTpx2-like* gene showed 12-23% higher efficiency than wild-type plants in net photosynthetic rate. The proline content in wild-type and transgenic plants increased after 10 days of water deficit: wild-type plants had an increase of 48% while in transgenic plants MDA levels were 50-72% higher. Malondialdehyde (MDA) content increased by 129% in wild-type plants and also in plants overexpressing *ScTpx2-like* gene, although in these transgenic plants MDA increases were lower than in wild-type plants, ranging from 20 to 107% in different events. Our data indicate that the overexpression of the *ScTpx2-like* gene reduces the effects of water deficit in sugarcane, opening perspectives for biotechnological applications in the development of new drought-tolerant commercial cultivars.

Key words: Sugarcane, *Tpx2-like*, water deficit, proline, MDA, drought

SUMARIO

1.INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo general.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Material vegetal.....	17
3.2 Clonagem da região codificante do gene <i>ScTpx2-like</i> no vetor de entrada pENTR-D-Topo.....	17
3.3 Subclonagem no vetor pGEM-T Easy.....	20
3.4 Clonagem no vetor final pGVG.....	22
3.5 Produção de plantas transgênicas.....	23
3.6 Aclimação das plantas.....	24
3.7 Análises moleculares e expressão gênica de plantas transgênicas de cana-de-açúcar.....	25
3.7.1 Caracterização molecular da integração do transgenes em cana de açúcar.....	25
3.7.2 Análise da expressão do transgene por RT-qPCR.....	25
3.8 Testes de tolerância ao déficit hídrico.....	27
3.8.1 Ensaio de capacidade de retenção de água do substrato.....	27
3.8.2 Multiplicação de eventos e desenho do bloco experimental.....	27
3.9 Análise fisiológica das plantas.....	28
3.9.1 Troca gasosa e atividade fotoquímica.....	28
3.9.2 Peroxidação lipídica.....	29
3.9.3 Concentração de prolina.....	29
4. RESULTADOS	30
4.1 Clonagem da região codificante do gene <i>ScTpx2-like</i>	30
4.2 Produção das plantas transgênicas.....	33
4.3 Genotipagem das plantas transgênicas de cana-de-açúcar.....	33
4.3.1. Amplificação da região codificante de <i>ScTpx2-like</i> e terminador 35S.....	33
4.3.2 Análise da expressão gênica por RT-qPCR.....	34

4.4 Testes de tolerância ao déficit hídrico.....	35
4.4.1 Análise da troca gasosa e atividade fotoquímica.....	36
4.4.2 Concentração de prolina.....	39
4.4.3 Peroxidação lipídica.....	40
5. DISCUSSÃO.....	41
6. CONCLUSÕES.....	45
7. BIBLIOGRAFIA	46
8. ANEXOS.....	51

1. INTRODUÇÃO

A cana de açúcar é uma cultura importante a nível mundial, sendo o Brasil o principal produtor (FAO, 2021). As exportações brasileiras na safra 2020/21 alcançaram 32,2 milhões de toneladas e as exportações de etanol foram de 2.950 milhões de litros (CONAB, 2021). A seca é o principal fator de estresse abiótico nas plantas e pode levar a perdas de produtividade de até 60% (Parry et al. 2004, Cruz de Carvalho, 2008, Robertson et al, 1999; Ramesh, 2000; Gentile et al, 2015). Por essa razão, as áreas de produção estão concentradas em regiões com regime de chuvas favorável ao crescimento e desenvolvimento da cana-de-açúcar (Moreira et al., 2007), enquanto em outras áreas a produção agrícola requer irrigação suplementar ou total (Walter et al., 2013).

O aumento da incidência, duração e intensidade do déficit hídrico levaram muitos programas de melhoramento de cana a investir em variedades tolerantes ao déficit hídrico, bem como sistemas de produção agrícola mais eficientes no uso da água. O crescente conhecimento da biologia do estresse proveniente de estudos genéticos, agrônômicos e de biologia molecular em várias culturas, incluindo a cana-de-açúcar, está dando um grande impulso ao desenvolvimento de estratégias biotecnológicas para produzir variedades tolerantes ao estresse hídrico e comercialmente úteis (Lakshmanan e Robinson, 2014; Augustine et al., 2015c; Ramiro et al., 2016, Ferreira et al., 2017).

Durante o déficit hídrico as plantas sofrem alterações fisiológicas que impactam no desenvolvimento e como resposta adotam mecanismos para se adaptar. Uma das primeiras alterações que experimentam é redução da taxa fotossintética (Lawlor e

Tezara.,2009; Graça et al., 2010) e o aumento do conteúdo de solutos compatíveis para proteger a planta do estresse oxidativo (Verslues et al., 2006).

Assim, no mecanismo de adaptação das plantas ao déficit hídrico são estudados os marcadores moleculares produzidos das reações bioquímicas em resposta ao estresse hídrico. Dentre dos marcadores moleculares de resposta ao estresse hídrico temos a prolina e o malondialdeído (MDA) (Molinari et al., 2007; Gratão et al., 2005; Queiroz et al., 2011).

A proteína Xklp2(TPX2) está associada a microtúbulos e a função fundamental no ciclo celular é auxiliar na montagem do fuso mitótico (Smertenko et al., 2021; Du et al., 2016; Neumayer et al.,2012; Ervrard et al., 2009; King et al., 2020). Estudos em células de *Xenopus* superexpressando a proteína TPX2 mostraram a exposição à radiação ionizante faz com que TPX2 acumule-se em regiões de quebra do DNA e se associa aos mediadores de danos MDC1 e ATM (Neumayer et al.,2012). Esses resultados sugerem que a proteína TPX2 tem uma função nuclear na resposta ao dano celular no DNA. Em outros trabalhos demonstraram que a proteína TPX2 está associada a ativação de aurora A quinase (Eyers e Maller, 2004) e na ligação da GTPase Ran ao GTP na montagem do fuso (Gruss et al., 2001).

As proteínas da família TPX2 estudadas em plantas têm funções diferentes na divisão celular e foram relacionadas na regulação na resposta ao estresse abiótico, alongamento do hipocótilo e desenvolvimento vascular (Smertenko et al., 2021). Em *Arabidopsis thaliana* foi demonstrado a interação da proteína TPX2 na ativação da Aurora

A (Boruc et al., 2019) e em *Eucalyptus grandis* observaram que a localização dos produtos gênicos está no citoesqueleto, associada aos microtúbulos (Du et al., 2016).

A proteína TPX2 apresenta o domínio conservado pfam06886, descrita como uma família da proteína de direcionamento para mamíferos para a proteína Xklp2. A proteína Xklp2 é uma proteína localizada no centrossoma de células animais, nucleando microtúbulos ao redor dos cromossomos. A proteína Tpx2 deduzida da cana-de-açúcar apresenta o domínio conservado pfam06886 (figura 1) que é um domínio presente na família de proteínas TPX2 estudadas em animais e plantas. De acordo com Ervvar et al., (2009) as proteínas da família que apresentam o domínio pfam06886 e as proteínas que possuem alguns blocos funcionais podem ser consideradas como proteínas relacionadas ao Tpx2. Neste trabalho a proteína deduzida de cana de açúcar foi denominada Tpx2-like seguindo a proposta de Ervvar et al., (2009).

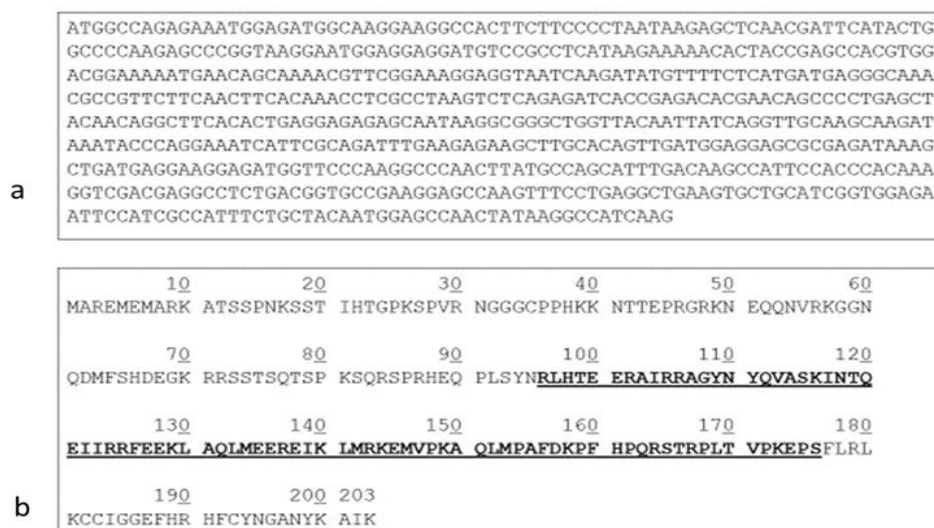


Figura 1. Gene *ScTpx2-like*. a) Sequência da região codificante do gene *ScTpx2-like*, b) Sequência de aminoácidos da proteína Tpx2-like, aminoácidos em negrito e sublinhados indicam o domínio conservado pfam06886 da proteína Tpx2-like.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa avaliou genes de cana-de-açúcar em plantas transgênicas de *Arabidopsis* usando o sistema de fenotipagem WIWAM no VIB, na Bélgica, desenvolvido por Skirycz et al., (2011). Os genes foram selecionados devido ao seu padrão de expressão em duas cultivares de cana: RB867515 (maior tolerância à seca) e RB855536 (menor tolerância à seca) cultivados em campo, sob irrigação e déficit hídrico (Diniz et al., 2020). Um dos genes avaliados foi um gene de cana-de-açúcar que codifica uma proteína do tipo Tpx2, denominada Tpx2-like de acordo com a classificação proposta por Evrard et al. (2009).

Como uma primeira abordagem para avaliar o papel do gene *ScTpx2-like* na tolerância ao déficit hídrico, foi aplicado um estresse severo, via água retida por duas semanas seguida de irrigação por um dia. Plantas de *Arabidopsis* com superexpressão de *ScTpx2-like* apresentaram maior porcentagem de sobrevivência quando comparadas com plantas controle transformadas com vetor vazio (Figura 2, Gonçalves et al., dados não publicados).

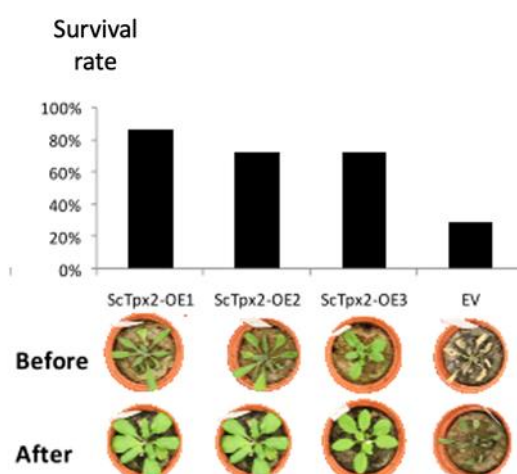


Figura 2. Avaliação da tolerância ao déficit hídrico severo. As plantas de *Arabidopsis thaliana* com dez dias de idade foram mantidas sem irrigação por duas semanas e depois reidratadas. As fotos foram tiradas um dia após a reidratação e o número de plantas

recuperadas foi determinado. Plantas transformadas com um vetor vazio foram usadas como controle. Foram utilizadas dez plantas de cada um dos três eventos independentes. O experimento foi repetido duas vezes com resultados semelhantes. *ScTpx2*-OE1, -OE2 e -OE3 são eventos independentes superexpressando *ScTpx2-like*; EV: plantas transformadas com um vetor vazio, sem o gene *ScTpx2-like*. (Gonçalves et al., dados não publicados).

Em um segundo ensaio, as plantas de *Arabidopsis thaliana* superexpressando o gene *ScTpx2-like* da cana-de-açúcar foram submetidas a estresse moderado, o que reduziu a área foliar em aproximadamente 30% (Gonçalves et al., dados não publicados). Na Figura 3 podemos observar a área de cada folha das plantas após 11 dias sob estresse moderado, sendo que as plantas transgênicas apresentam consistentemente uma área maior.

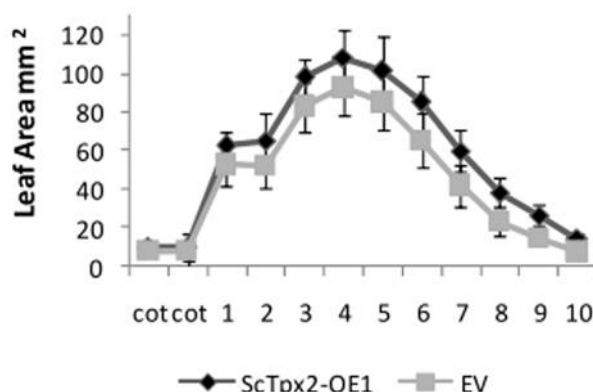


Figura 3. Efeito do déficit moderado de água na área foliar. As plantas de *Arabidopsis thaliana* foram semeadas e mantidas em condições normais de irrigação (2,2 g de água / g de solo seco) por 10 dias. Em seguida, 16 vasos de cada linha continuaram a receber a quantidade normal de água, enquanto outras 16 receberam 1,2 g de água / g de solo seco (déficit moderado de água). Após 11 dias, a área foliar foi medida através de fotos tiradas das séries foliares de cada planta usando o software ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Os

gráficos mostram a área foliar (mm²), em condições de déficit hídrico moderado, de linhas transgênicas que superexpressam o gene semelhante ao *ScTpx2-like*. O eixo X indica os cotilédones (cot) e as diferentes folhas (numeradas de 1 a 10). Plantas transformadas com o vetor vazio (VE) foram usadas como controle. O experimento foi repetido duas vezes com resultados semelhantes. (Gonçalves et al., dados não publicados).

Assim, os resultados observados com a superexpressão do gene *ScTpx2-like* da cana-de-açúcar corroboram o potencial biotecnológico de manipular a tolerância ao déficit hídrico em plantas. Baseado nos dados acima, é possível levantar a hipótese de que a superexpressão do gene *ScTpx2-like* pode melhorar a performance de plantas de cana quando expostas a déficit hídrico.

2. Objetivos.

2.1 Objetivo general.

Nosso principal objetivo é avaliar o papel do gene *ScTpx2-like* na tolerância ao déficit hídrico da cana-de-açúcar.

2.2 Objetivos específicos.

- a) Produzir uma construção de DNA para superexpressar o gene *ScTpx2-like* na cana-de-açúcar.
- b) Transferir a construção de DNA para o genoma da cana-de-açúcar e avaliar as plantas transgênicas para confirmar a superexpressão do transgene.
- c) Avaliar a fisiologia das plantas transgênicas de cana-de-açúcar em resposta ao déficit hídrico em termos de fotossíntese, prolina e estresse oxidativo.

3. Material e métodos.

3.1 Material vegetal.

Para a transformação genética foram usadas plantas de cana de açúcar, cultivar SP803280 obtidas do banco de germoplasma do Laboratório de Genômica Funcional do Departamento de Genética, Evolução e Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (Campinas, Brasil).

3.2 Clonagem da região codificante do gene *ScTpx2-like* no vetor de entrada pENTR-D-Topo.

A clonagem da região codificante do gene *Tpx2-like* no vetor final foi feita de acordo ao esquema da figura 4. A sequência codificante completa (CDS) do gene *ScTpx2-like*, deduzida do SAS SCJFRT2059C10.g, foi previamente amplificada por Gonçalves et al. (dados não mostrados) e clonada no vetor pGWB608 (Nakamura et al. 2010). A partir da CDS foram desenhados os oligonucleotídeos flanqueando 5' e 3' (Tabela 1), adicionado ao oligonucleotídeo *forward* a sequência CACC, os quais foram analisados com software computacional OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>).

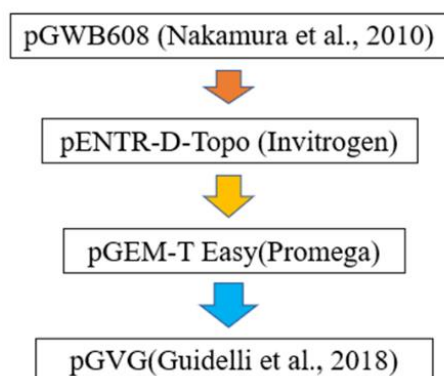


Figura 4. Fluxograma de clonagem do gene ao vetor final pGVG (Guidelli et al., 2018). A CDS do gene *ScTpx2-like* foi amplificada a partir de um clone no vetor pGWB608 e clonada no vetor pENTR-D-Topo. Em seguida, desse vetor foi amplificada a CDS flanqueada pelos sítios attL e o inserto foi clonado em pGEM-T Easy, que posteriormente foi transferido para o vetor pGVG pela tecnologia Gateway.

Tabela 1: Oligonucleotídeos desenhados do gene *ScTpx2-like*

Gene	Seq 5'>3'
<i>Tpx2-like_FW</i>	CACCATGGCCAGAGAAATGGAGAT
<i>Tpx2-like_RV</i>	GATGGCCTTATAGTTGG

Para a reação de PCR (reação em cadeia da polimerase) foi utilizada a enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific). A reação de PCR consistiu em 1 µL de DNA plasmidial (pGWB608 contendo a CDS de *ScTPX2-like*), 0,2 µL de polimerase de DNA de alta fidelidade Taq Phusion (Thermo Scientific), 1 µL de dNTPs (10 mM), 5 µL de tampão de reação (5X tampão), 1 µL de cada oligonucleotídeo (10 mM) e água Milli-Q para um volume final de 25 µL. As reações foram amplificadas no termociclador Veriti (Applied Biosystems) (Tabela 2).

Tabela 2: Descrição da ciclagem da PCR usada em cada amplificação.

Etapa	Temperatura	Duração	Número de ciclos
Desnaturação inicial	98°C	30 segundos	1
Desnaturação	98°C	10 segundos	35x
Anelamento (T _m)	48°C	30 segundos	
Extensão	72°C	30 segundos	
Extensão final	72°C	10 minutos	1
Hold	4°C	∞	∞

O produto de PCR foi observado por eletroforese em gel de agarose a 1% e purificado com o kit Purelink Quick PCR (Invitrogen). O produto PCR purificado foi observado em eletroforese em gel de agarose a 1% para verificar a eficiência da purificação. Em seguida foi feita a reação de ligação que consistiu em 1 µL de produto de PCR purificado do gene, 1 µL do vetor pENTR-D-Topo (Invitrogen) (Figura 5), 1 µL de tampão de reação e água Mili-Q para um volume final 6 µL. A reação de ligação foi incubada por 5 minutos a 22 °C no termociclador Veriti (Applied Biosystems).

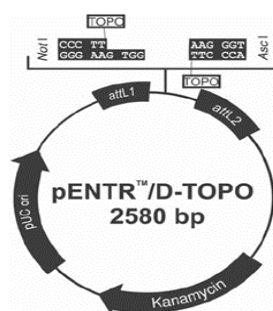


Fig 5. Mapa do vetor pENTR-D-TOPO sistema gateway.

Fonte: Janmohamed et al., 2006.

A transformação foi realizada em células *E. coli* DH5alfa termo-competentes, a 42 °C. As células foram plaqueadas em meio LB (Luria Bertani) sólido contendo o antibiótico de seleção Canamicina e colocadas na estufa a 37 °C durante a noite. Algumas

das colônias foram selecionadas para inoculação em meio LB líquido contendo antibiótico de seleção Canamicina. As culturas foram incubadas durante a noite à 37 °C, 200 rpm em um agitador orbital e posteriormente foi realizada a extração do DNA plasmidial. Para confirmar a inserção, foram realizadas reações de digestão com enzimas de restrição e as amostras foram enviadas para sequenciamento e confirmação da identidade do gene. A construção resultante foi denominada *ScTpx2-like*- pENTR.

3.3 Subclonagem no vetor pGEM-T Easy.

A clonagem no vetor de destino pGVG (Guidelli et al., 2018) via tecnologia Gateway (vide adiante) tem incompatibilidade com o vetor pENTR-D Topo, pois ambos têm resistência a Canamicina. Para contornar este problema, o vetor *ScTpx2-like*- pENTR foi submetido a uma PCR com primers M13 (5'GTAAACGACGGCCAG 3' e 5 CAGGAAACAGCTATGAC 3') que amplificaram o fragmento contendo attL1, a região codificante de *ScTpx2-like* e attL2, para posterior clonagem no vetor pGEM-T Easy (Promega), que tem resistência a ampicilina. A reação de PCR consistiu em 2 µL de DNA plasmidial (*ScTpx2-like*- pENTR), 2,5 µl de tampão de alta fidelidade (10X), 1 µl de MgSO₄ (50Mm), 0,5 µL de dNTPs (10 mM), 1 µL de cada oligonucleotídeo (10 mM) 0,2 µL de Taq DNA polimerase Platinum (Invitrogen) e água Milli-Q para um volume final de 25 µL. As reações foram amplificadas no termociclador Veriti (Applied Biosystems) (Tabela 3).

Tabela 3: Descrição da ciclagem da PCR usada em cada amplificação.

Etapa	Temperatura	Duração	Número de ciclos
Desnaturação inicial	94°C	2 minutos	1
Desnaturação	94°C	15 segundos	35x
Anelamento (T _m)	55°C	30 segundos	
Extensão	68°C	1 minuto	
Hold	4°C	∞	

O produto de PCR foi observado por eletroforese em gel de agarose a 1% e purificado com Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (New England BioLabs). Foi feito de novo eletroforese em gel de agarose a 1% para verificar a qualidade da purificação. A reação de ligação consistiu em 5 µL de tampão de ligação T4 DNA, 1 µL de vetor pGEM-T Easy (Promega) (Figura 6), 3 µL de produto de PCR purificado (attL1-*ScTpx2-like* attL2), 1 µL de enzima T4 DNA ligase. O volume final foi de 10 µL. A reação de ligação foi incubada durante a noite à 4 °C.

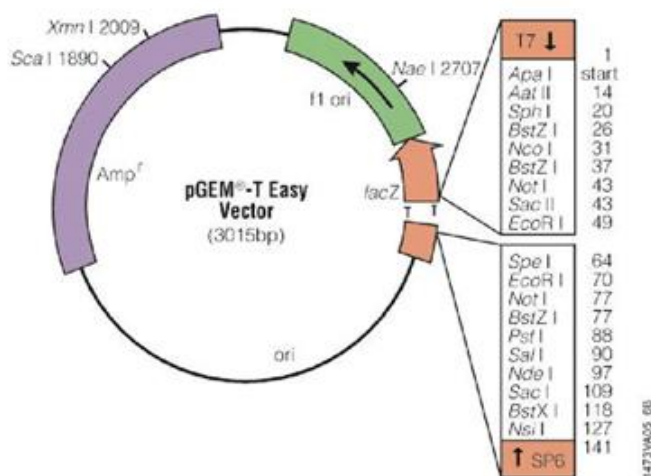


Fig 6. Mapa do vetor pGEM-T Easy. Fonte: Kumar, A. (2016)

No dia seguinte a transformação foi realizada em células *E. coli* Mach 1 termo-competentes, à 42 °C. As células foram plaqueadas em meio LB sólido contendo o antibiótico de seleção ampicilina e colocadas na estufa à 37 °C durante a noite. Algumas colônias foram selecionadas para inoculação em meio LB líquido contendo ampicilina como antibiótico de seleção e incubadas durante a noite à 37 °C a 200 rpm em agitador orbital. Em seguida foi realizada extração do DNA. Para confirmar a inserção do inserto attL1-*ScTpx2-like*-attL2 foram realizadas reações de digestão com enzimas de restrição, posteriormente as amostras foram enviadas ao sequenciamento para confirmar a identidade do gene. A construção foi denominada *ScTpx2-like*-pGEM-T Easy.

3.4 Clonagem no vetor final pGVG.

A construção *ScTpx2-like*-pGEM-T Easy foi usada em reação de recombinação para o vetor final pGVG (Guidelli et al., 2018) (Figura7). A reação consistiu em 4 µL de DNA plasmidial (*ScTpx2-like*-pGEM-T Easy), 1 µL de vetor pGVG (Guidelli et al., 2018), 3 µL de tampão TE, 2 µL de LR clonase II (Invitrogen). A reação foi incubada à 25 °C por 1 hora no termociclador Veriti (Applied Biosystems). Em seguida foi adicionado 1µL de Proteinase K e a reação foi colocada de volta no termociclador à 37 °C por 10 minutos.

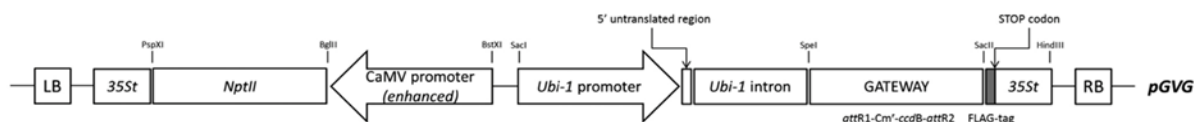


Figura 7. Representação esquemática do vetor pGVG. O vetor contém o esqueleto do vetor pCAMBIA2300, modificado pela inserção do promotor *ZmUbi1* (incluindo o primeiro íntron na região do éxon referenciado na região 5' não traduzida) e o promotor *CaMV* 35S. Sequências do sistema Gateway foram inseridas entre o promotor *ZmUBi1* e

o terminador CaMV 35S. Uma etiqueta FLAG é posicionada imediatamente antes do terminador para facilitar a detecção de proteínas recombinantes. O vetor contém o gene *NPTII* como marcador seletivo sob o controle do promotor 35S duplicado. *Cmr* é o gene de resistência ao cloranfenicol, *ccdB* é o gene letal, RB é a borda direita e LB é a borda esquerda. Fonte: Guidelli et al., (2018).

A transformação foi realizada em células *E. coli* Mach 1 termo-competentes, à 42 °C. As células foram plaqueadas em meio LB sólido (Luria Bertani) contendo o antibiótico de seleção Canamicina e colocadas na estufa à 37 °C durante a noite. Algumas das colônias foram selecionadas para inoculação em meio LB líquido contendo Canamicina como antibiótico de seleção e incubadas durante a noite à 37 °C à 200 rpm em agitador orbital e então realizada a extração do DNA. Para confirmar a inserção no vetor final pGVG foram realizadas reações de digestão com enzimas de restrição. Posteriormente as amostras foram enviadas para serem sequenciadas e confirmar a construção, denominada *ScTpx2-like*- pGVG.

3.5 Produção de plantas transgênicas.

A transformação em *A. tumefaciens* com a construção *ScTpx2-like*-pGVG foi realizada em células termo-competentes EHA105, à 37 °C. As células foram plaqueadas em meio LB sólido contendo os antibióticos de seleção Canamicina e rifampicina, foi incubada na estufa à 28 °C por 2 dias. Algumas das colônias foram selecionadas para riscar a outra placa e inoculadas em meio LB líquido contendo Canamicina e rifampicina. As placas foram incubadas na estufa à 28 °C por 2 dias e colônias resultantes foram incubadas à 28 °C por 2 dias com agitação de 200 rpm em um agitador. Posteriormente, foi realizada a extração do DNA. Para confirmar a transformação da *A. tumefaciens* foram

realizadas reações de PCR e reações de digestão com enzimas de restrição. Posteriormente, confirmando que as construções genéticas estavam em *Agrobacterium*, a placa foi entregue à empresa Pangeia Biotech para transformação em calos que após de 4 meses foram entregues as plantas.

3.6 Aclimação das plantas.

Foram selecionados 20 eventos da construção gênica e 5 eventos selvagens (WT). A mistura de substrato foi de vermiculita e terra vegetal (Provaso) em bandejas de aclimação. O meio de cultura e o excesso de raízes e folhas foram removidos. Cada um de os eventos foi colocado em cada poço da bandeja, que foi selada com filme plástico. Após de 24 horas foram feitos pequenos orifícios e após 24 horas foram feitos orifícios maiores. Após 72 horas aproximadamente o filme plástico foi removido. O período de aclimação foi de 1 mês. Após o mês de aclimação os eventos foram transferidos a vaso grande (capacidade de 20 litros) (figura 8). O substrato do vaso grande consistiu em um terço de vermiculita (Provaso), um terço de areia, um terço de terra vermelha.



Figura 8. Eventos de cana de açúcar transgênicos e selvagens transferidos para vaso de 20 L.

3.7 Análises moleculares e expressão gênica de plantas transgênicas de cana-de-açúcar.

3.7.1 Caracterização molecular da integração do transgenes em cana de açúcar.

A integração do transgenes foi avaliada por PCR de DNA genômico, extraído de tecido foliar da folha superior totalmente expandida com a lígula visível (folha+1) segundo o método CTAB (Doyle, J.L. 1987), modificado. Foi feito uma PCR empregando oligonucleotídeos que flanqueiam com a região codificante de *ScTpx2-like* e do terminador 35S (Tabela 4) presentes nas construções *ScTpx2-like*-pGVG.

Tabela 4: Oligonucleotídeos para PCR

Gene	Seq 5'>3'
<i>ScTpx2-like</i> _Fw	ATGGCCAGAGAAATGGAGAT
T35S-pGVG-Rv	AGG TCA CTG GAT TTT GGT TTT AGG A

3.7.2 Análise da expressão do transgene por RT-qPCR

Inicialmente foi extraído o RNA do tecido foliar da folha +1 com método Trizol (Invitrogen). Para observar a integridade do RNA foi submetido a uma eletroforese com gel de agarose 1% para RNA, em seguida foi quantificado no nanodrop. A reação de tratamento com DNase I (ThermoFisher) consistiu em 1 µg de RNA, 1 µl de buffer 10x, 1 µl de enzima DNase I e água DEPC até um volume final de 10 µl. A reação foi incubada à 37°C por 30 min no termociclador Veriti (Applied Biosystems). Em seguida foi adicionado 1 µl de EDTA 50 Mm e a reação foi incubada à 65°C por 10 minutos no termociclador. A reação de síntese de cDNA consistiu em 1 µg de RNA, 1 µl de Script Reverse Transcriptase (Bio-Rad), 4 µl de Script reaction mix 5x, água livre de nuclease até um volume final de 20 µl. A reação foi incubada no termociclador Veriti Applied Biosystems (Tabela 5).

Tabela 5. Ciclagem da síntese de cDNA.

Etapa	Temperatura	Duração
Preparação	25°C	5 minutos
Transição reversa	46°C	20 minutos
RT inativação	95°C	1 minuto
Hold	4°C	∞

A confirmação do padrão de expressão de *ScTpx2-like* foi feita por PCR em tempo real (com três réplicas técnicas) utilizando oligonucleotídeos da região codificante do gene *Tpx2-like*. Como controle interno foi usado oligonucleotídeos para o gene da ubiquitina (Tabela 6). As reações foram realizadas com kit SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA), no aparelho 7500 Real-Time Sistema de PCR (Applied Biosystems, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. A normalização dos dados de expressão foi realizada com o gene da poliubiquitina (pUBI) (Papini-Terzi et al., 2005). Cada padrão de expressão foi comparado com o gene de referência de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001) utilizando o programa Expression Suite software versão 1.3.

Tabela 6: Oligonucleotídeos para RT- qPCR.

Gene	Seq 5'>3'
<i>Tpx2-like_Fw</i>	GAAGCTTGCACAGTTGATGGA
<i>Tpx2-like_Rv</i>	GCTGGCATAAGTTGGGCCTT
<i>pUBI Fw</i>	CCGGTCCTTTAAACCAACTCAGT
<i>pUBI Rv</i>	CCCTCTGGTGTACCTCCATTTG

3.8 Testes de tolerância ao déficit hídrico

3.8.1 Ensaio de capacidade de retenção de água do substrato.

A determinação da capacidade de retenção de água do substrato foi feita da seguinte maneira: O substrato consistiu em um terço de vermiculita (Provaso), um terço de areia, um terço de terra vermelha. A mistura de substrato foi colocada no forno a 50 °C até secar completamente. Depois foi feito o ensaio da capacidade de retenção de água na casa de vegetação. Foi pesado 1kg de substrato e colocado em um vaso, logo foi feita uma irrigação saturada, em seguida esperamos 10 minutos para que a água drene. Após drenar toda a água em excesso cada vaso foi pesado e calculada a quantidade de água que é capaz de reter o substrato. Foi feito 4 réplicas, o substrato teve a capacidade de reter 341 g H₂O /kg de substrato.

3.8.2 Multiplicação de eventos e desenho do bloco experimental.

Os 5 eventos com maior padrão de expressão do gene *ScTpx2-like* foram submetidos a multiplicação de gemas laterais. Após 30 dias de germinação das gemas, foram selecionadas 5 réplicas de cada evento transgênico e de plantas selvagens, que foram transferidas para vaso de 20 litros (Figura 9). A distribuição de vasos em casa de vegetação foi feita usando um desenho de blocos completos aleatórios, para evitar efeitos de posição.

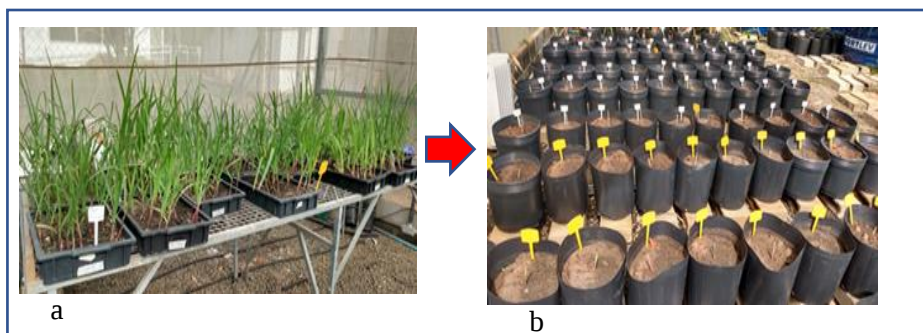


Figura 9. a) Gemas germinadas dos eventos do gene *Tpx2-like* e selvagens para controle, b) réplicas dos eventos transferidos a vaso de 20 litros.

3.9 Análise fisiológica das plantas.

O período experimental teve uma duração de 25 dias. No dia 0 foram avaliadas todas as plantas a 100% da capacidade do vaso, enquanto os dias 9, 16 e 18 a capacidade de vaso foi de 30%. No dia 19 foi feita a reidratação das plantas e nos dias 22 e 25 foi avaliada a recuperação após reidratação. Para o caso de prolina e MDA foi coletado tecido folhar no dia 0 e dia 18 (último dia submetido a déficit hídrico de 30% de capacidade do vaso) e as análises da troca gasosa foram avaliadas todos os indicados no texto.

3.9.1 Troca gasosa e atividade fotoquímica.

As trocas gasosas e a atividade fotoquímica de folhas foram medidas diariamente durante a suspensão da irrigação e reidratação das plantas durante todo o período experimental, com um analisador de gás infravermelho (LCpro-SD, ADC Bioscientific.). As medições foram feitas entre 9:00 e 13:00 sob radiação fotossensitivamente ativa (PPD) de $2.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura dentro da câmara foliar de 25°C e a concentração de CO_2 de $380 \mu\text{mol mol}^{-1}$. Foram medidas a fotossíntese (A), condutância estomática (gs), concentração de CO_2 intercelular (Ci) e transpiração (E).

3.9.2 Peroxidação lipídica.

A peroxidação lipídica foi determinada pela estimativa do teor de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) seguindo o método de (Heath e Packer, 1968), com modificações. Um total de 200 mg de tecidos foliares foi pulverizado em almofariz com nitrogênio líquido e homogeneizado em solução 80:20 (v/v) etanol:água com 3 mililitros de volume final. As amostras foram centrifugadas à 3.000 rpm por 10 min. Um ml do extrato foi coletado em um tubo Falcon de 15 mL e misturado com mais 1 ml de solução de TCA 20% (p/v) (ácido tricloroacético) e 0,65% (p/v) de TBA (ácido tiobarbitúrico). A mistura foi agitada vigorosamente e incubada à 100°C por 25 min. Em seguida o tubo foi transferido para o gelo até esfriar e centrifugado à 3.000 rpm por 10 min. As leituras das absorvâncias foram feitas nos comprimentos de onda 532 nm e 600 nm. A determinações equivalentes de MDA foram calculadas utilizando o coeficiente de extinção molar de 155 mm.cm⁻¹. Os resultados foram expressos em nmol de MDA/g MF (massa fresca).

3.9.3 Concentração de prolina.

A determinação da concentração de prolina nas folhas foi feita de acordo com Bates et al., (1973), com modificações. Um total de 50 mg de tecido vegetal foi macerado em nitrogênio líquido até obter um pó fino e misturado com 3 mL de ácido sulfosalicílico a 3% (p/v). A 1 ml do sobrenadante foi acrescentado 1 ml de ninhidrina acida (0,63 g de ninhidrina, 15 ml de ácido acético glacial, 10 ml de ácido fosfórico 6 M e 1 ml de ácido acético glacial). As amostras foram incubadas à 100 °C durante 1 hora e depois transferidas para o gelo. Após esfriar completamente, as leituras foram feitas em triplicata

a comprimentos de onda 520 nm no espectrofotômetro Perkin Elmer - Lambda 40. Os resultados foram expressos em μg de prolina/g MF.

4. Resultados

4.1 Clonagem da região codificante do gene *ScTpx2-like* no vetor pGVG.

A região codificante do gene *ScTpx2-like* de 609 pb havia sido previamente clonada a partir de cDNA de folhas da variedade de cana SP80 3280 (Gonçalves et al., dados não publicados). Para a clonagem no vetor pGVG, que usa a tecnologia Gateway, a região codificante completa foi amplificada com oligonucleotídeos (Tabela 1, Material e Métodos) e o produto de PCR foi clonado inicialmente no vetor de entrada pENTR-D-TOPO.

Para confirmar o inserto no vetor de entrada foi feita uma PCR com oligonucleotídeos específicos, que gerou o fragmento esperado de 609 pb (Figura 10a). Foram feitas também reações de digestão com as enzimas SacI e EcoRV gerando dois fragmentos esperados de 2.506 pb e 683 pb (Figura 10b). O vetor foi denominado *ScTpx2-like*- pENTR.

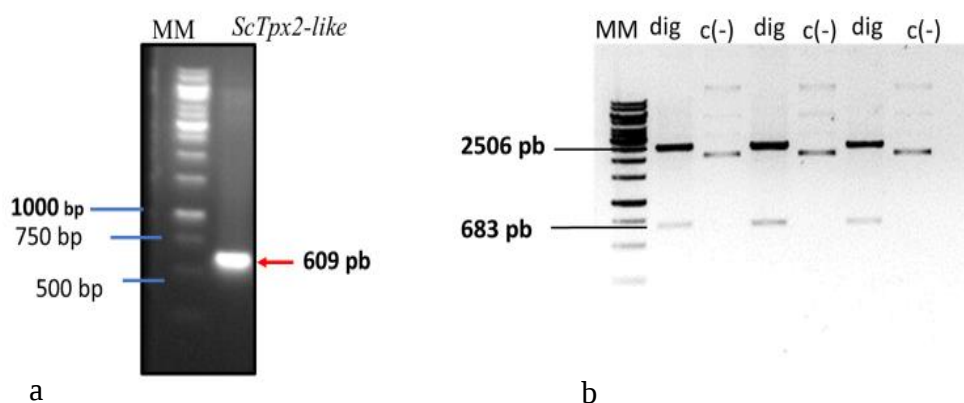


Figura 10. Confirmação da região codificante do gene *ScTpx2-like* no vetor de entrada pENTR-D-TOPO. a) PCR com oligonucleotídeos específicos do gene *ScTpx2-like*, b) reações de digestão com as enzimas de restrição *SacI* e *EcoRV* gerando dois fragmentos de 2506 pb e 683 pb. MM (marcador molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder).

Uma vez que o vetor final de destino pGVG tem resistência à Canamicina, que é o mesmo marcador seletivo do vetor pENTR-D-TOPO, foi necessário transferir o inserto contendo as regiões attL1:*ScTpx2-like*:attL2 para o vetor pGEMT-Easy, que tem marcador seletivo para ampicilina. Para tal foi feita reação de PCR tendo como template o vetor *ScTpx2-like*-pENTR, empregando primers M13 que flanqueiam essa região. O inserto foi clonado no vetor pGEM-T Easy (Promega). A ligação foi confirmada com reações de digestão com a enzima de restrição *EcoRI* gerando os três fragmentos de 2.997, 719 e 233 pb (Figura 11a). Esse vetor, denominado *ScTpx2-like*-pGEM-T Easy, foi recombinado com o vetor pGVG (Guidelli et al., 2018) e a confirmação foi feita com reações de digestão com a enzima de restrição *SacI* gerando os dois fragmentos, de 9.563 e 2.071 pb (Figura 11b). A construção final, contendo a região codificante do gene *ScTpx2-like* sob controle do promotor Ubi-1 de milho, foi denominada *ScTpx2-like*-pGVG (Figura 12).

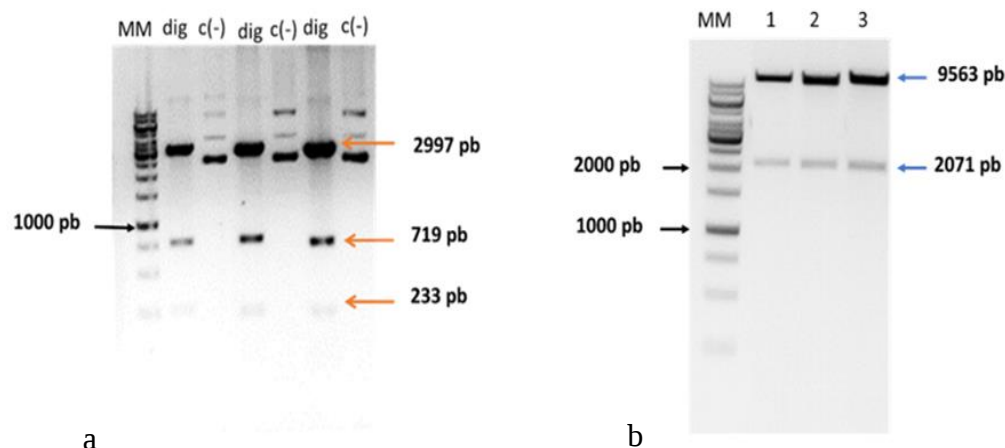


Figura 11. Confirmação da região codificante do gene *ScTpx2-like* no vetor pGEM-T EASY e PGVG. a) Confirmação no vetor pGEM-T EASY, reações de digestão com a enzima de restrição EcoRI gerando três fragmentos de 2997 pb, 719 pb e 233pb, b) Confirmação no vetor PGVG, reações de digestão com a enzima de restrição SacI gerando dois fragmentos de 9563 pb e 2071 pb. MM (marcador molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder).

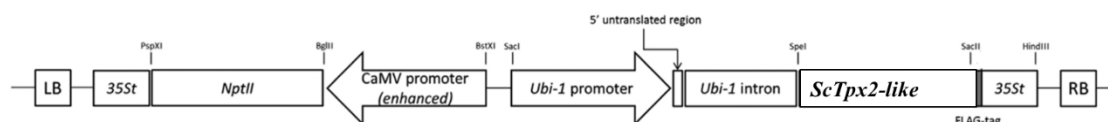


Figura 12. Representação esquemática da construção final *ScTpx2-like*-pGVG. O vector contém o esqueleto do vector pCAMBIA2300, modificado pela inserção do promotor *ZmUbi1* (incluindo o primeiro íntron na região do éxon referenciado na região 5' não traduzida) e o promotor *CaMV 35S*. Sequências do sistema Gateway foram inseridas entre o promotor *ZmUBi1* e o terminador *CaMV 35S*. Uma etiqueta FLAG é posicionada imediatamente antes do terminador para facilitar a detecção de proteínas recombinantes. O vector contém o gene *NPTII* como marcador seletivo sob o controle do promotor 35S duplicado. *Cmr* é o gene de resistência ao cloranfenicol, *ccdB* é o gene letal, RB é a borda direita e LB é a borda esquerda. Fonte: Guidelli et al., (2018).

4.2 Produção das plantas transgênicas.

A construção *ScTpx2-like*-pGVG confirmada foi transformada a *Agrobacterium tumefaciens* EHA105, após de confirmar com PCR e reações de digestão a colônia que melhor ficou foi entregue a Pangeia Biotech (Star-up incubada na Unicamp) para a transformação em calos e cultivo in vitro até obter plântulas.

Após 4 meses, 20 eventos de plantas transgênicas e 5 eventos do tipo selvagem, que passaram pela cultura de tecidos, foram entregues pela empresa PangeiaBiotech. A partir deles, as plântulas foram individualizadas e os eventos aclimatados em tubetes contendo solo e vermiculita. Após 1 mes, os eventos foram transferidos para vasos de 20L.

4.3 Genotipagem das plantas transgênicas de cana-de-açúcar.

4.3.1. Amplificação da região codificante de *ScTpx2-like* e terminador 35S.

Os 14 eventos transgênicos que passaram a etapa de aclimação e os eventos selvagem foram submetidos a uma PCR empregando oligonucleotídeos que pareiam com a região codificante de *ScTpx2-like* -pGVG e do terminador 35S, gerando um fragmento de 916 pb. Foram confirmados 9 eventos transgênicos, cuja amplificação resultou no produto do tamanho esperado, enquanto plantas do tipo selvagem não apresentaram amplificação, como esperado (Figura 13).

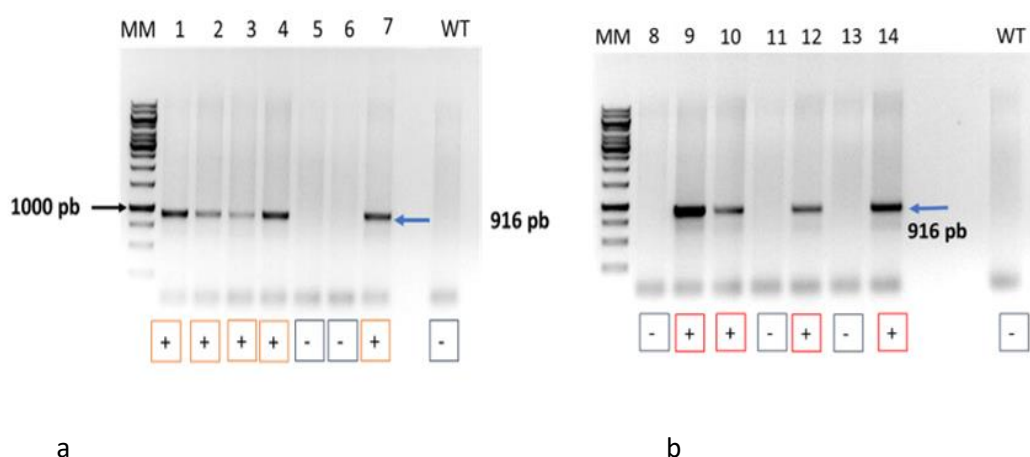


Figura 13. Confirmação dos eventos transgênicos. a) Eventos 1,2,3,4 e 7 foram positivos, b) Eventos 9,10,12 e 14 foram confirmados positivos. MM: Marcador de peso molecular; WT: plantas do tipo selvagem.

4.3.2 Análise da expressão gênica por RT-qPCR.

Os 9 eventos transgênicos confirmados foram submetidos a RT-qPCR em tempo real para a confirmação da superexpressão do gene *ScTpx2-like*. Como controle interno foi usado o gene da ubiquitina. Foram selecionados 5 eventos com o maior padrão de expressão do gene *ScTpx2-like* para os testes de déficit hídrico, indicados com asterisco na Figura 14. Cada padrão de expressão foi comparado com o gene de referência de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001) utilizando o programa Expression Suite software versão 1.3.

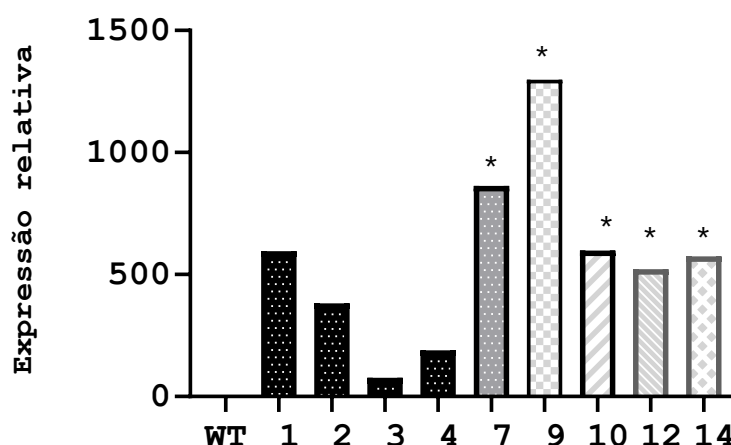


Figura 14. Análise da super expressão do gene *ScTpx2-like* por PCR em tempo real. No eixo X estão indicados o tipo selvagem (WT) e o identificador numérico de cada evento transgênico que superexpressa o gene *ScTpx2-like*.

4.4 Testes de tolerância ao déficit hídrico.

As 30 plantas resultantes da multiplicação dos 5 eventos transgênicos e selvagem foram instalados em blocos completos aleatórios, para evitar efeitos de posição. As plantas foram mantidas sob irrigação plena por 4 meses até começar o experimento de déficit hídrico. No início do experimento (dia 0), foram iniciadas as medições de fotossíntese. No dia 1 foi suspensa a irrigação até obter 30% de capacidade do vaso. Cada dia foi controlado a perda de água pesando os vasos em uma balança e a capacidade de 30% foi atingida no dia 7. Durante 10 dias, até o dia 18 foi acrescentada diariamente água para manter a 30% de capacidade. Em seguida, as plantas foram rehidratadas a 100% da capacidade do vaso e após 3 e 6 dias foi feita a avaliação da capacidade de recuperação das plantas do déficit hídrico.

4.4.1 Análise da troca gasosa e atividade fotoquímica.

Comparando o desempenho fotosintético de plantas que superexpressam o gene *ScTpx2-like* e selvagens, observamos que em geral todas as plantas tiveram uma diminuição da fotossíntese. Após os 10 dias submetidas a déficit hídrico as plantas selvagens tiveram uma queda de 96 % da taxa fotosintética e nas plantas que superexpressam o gene *Tpx2-like* a queda foi menor, variando de 73% e 84% nos distintos eventos. Os eventos transgênicos que mais se destacaram no dia 16 foram os eventos 9, 10, 12 e 14 e no dia 18 os eventos 7, 9 e 12 (figura 15, tabela 1 dos anexos). Nota-se que as plantas selvagens apresentaram uma forte redução na fotossíntese ao longo do déficit hídrico e que de forma geral, os eventos que superexpressam o gene *ScTpx2-like* não só apresentaram menor redução da fotossíntese como também recuperaram mais rapidamente os níveis normais após a reidratação.

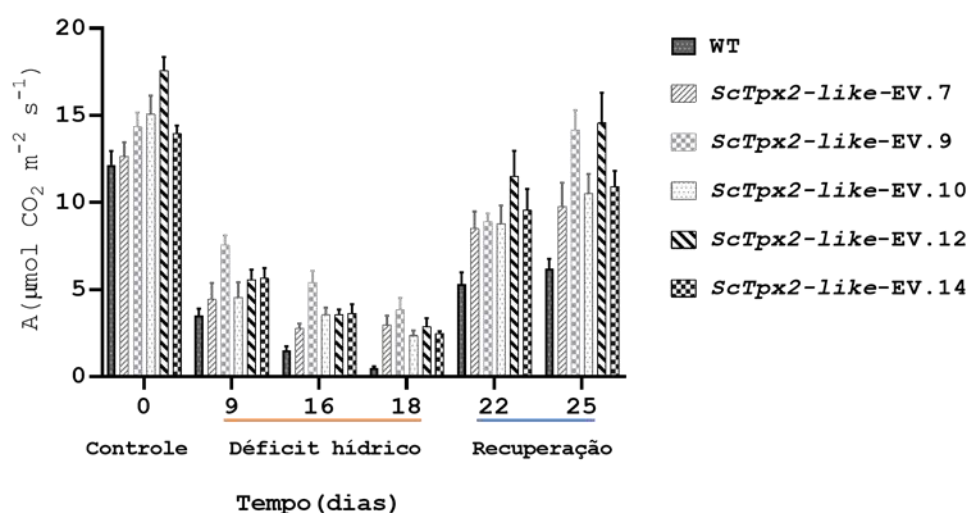


Figura 15. Análise da fotossíntese. Taxa da fotossíntese ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) para os 5 eventos transgênicos que superexpressam o gene *ScTpx2-like* e plantas selvagem, durante o período do experimento de déficit hídrico.

A condutância estomática das plantas submetidas ao déficit hídrico está mostrada na Figura 16. Após os 10 dias de déficit hídrico a uma capacidade de vaso de 30% as plantas selvagens apresentaram uma queda da condutância estomática de 85%, enquanto que nas plantas que superexpressam o gene *Tpx2-like* a queda foi entre 42% e 85% dentre os 5 eventos. Dentre dos eventos transgênicos, os que tem destaque no dia 9 foram os eventos 9, 10, 12 e 14, no dia 16 eventos 9, 12 e 14, e no dia 18 os eventos 7, 9 e 14 (Figura 16, tabela 2 dos anexos). De forma similar ao observado com a fotossíntese, a condutância estomática nos eventos transgênicos retornou aos níveis pré-estresse mais rapidamente que as plantas selvagens.

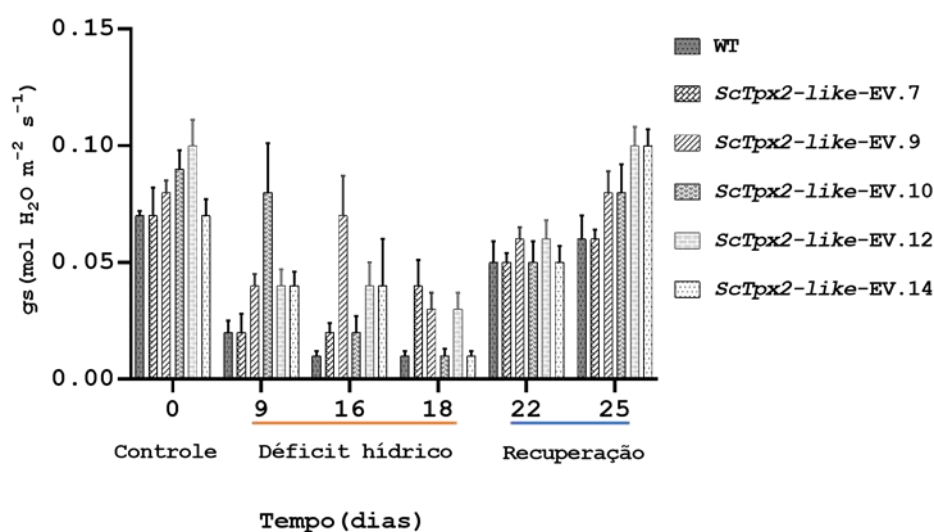


Figura 16. Análise da condutância estomática. Os 5 eventos transgênicos que superexpressam o gene *ScTpx2-like* de cana-de-açúcar e plantas selvagem foram avaliados quanto à condutância estomática (gs , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$), durante o período do experimento de déficit hídrico.

Comparando a taxa de transpiração durante o período de déficit hídrico, no dia 9, 16 e 18 foi observada uma diminuição nas plantas selvagens e plantas que

superexpressam o gene *Tpx2-like*. Após 10 dias de déficit hídrico a queda da taxa de transpiração nas plantas selvagens foi de 84% e nos 5 eventos de plantas que superexpressam o gene *Tpx2-like* foi entre 46% e 83%. Dentre dos eventos transgênicos os que tiveram menor queda da taxa de transpiração foram os eventos 9, 10 e 12 no dia 9, eventos 9,12, e 14 no dia 16 e eventos 7, 9 e 12 no dia 18 (Figura 17, tabela 3 dos anexos). Porém, as diferenças comparativamente ao tipo selvagem não foram tão evidentes quanto as observadas para a fotossíntese (Figura 15) e condutância estomática (Figura 16).

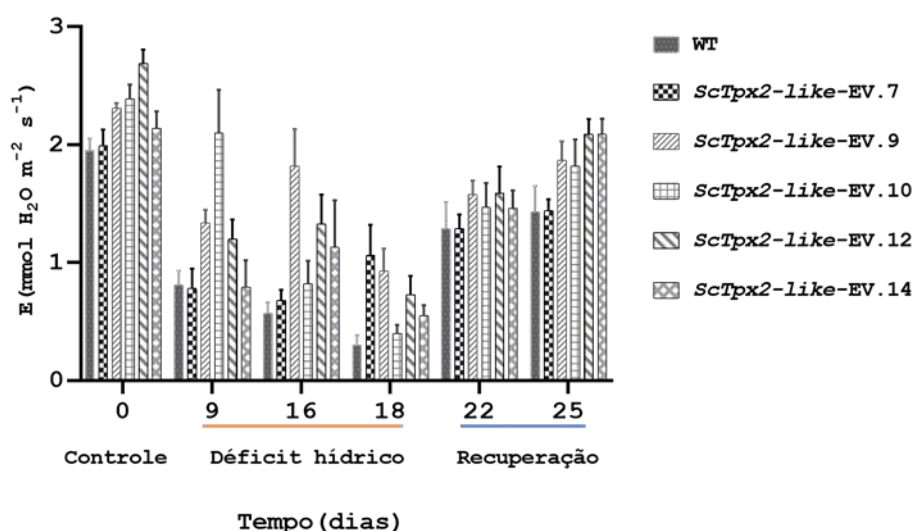


Figura 17. Análise da taxa de transpiração ao longo do período de estresse e de reidratação. A taxa de transpiração E ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para os 5 eventos transgênicos que superexpressam o gene *Tpx2-like* de cana-de-açúcar e plantas controle selvagem foi avaliada durante o período do experimento de déficit hídrico.

4.4.2 Concentração de prolina.

A prolina livre é indicador bioquímico e fisiológico de deficiência de água (Queiroz et al., 2011). De acordo com Molinari et al., (2007), o acúmulo de prolina protege as plantas do estresse oxidativo induzido pelo déficit hídrico. Todas as plantas submetidas ao déficit hídrico mostraram um aumento no acúmulo de prolina após 10 dias sob déficit hídrico. O incremento de prolina nos 5 eventos que superexpressam o gene *ScTpx2-like* variou entre 50% e 72%, sendo que as plantas de tipo selvagens apresentaram um incremento de 48%. Assim, os eventos transgênicos apresentaram uma tendência de maiores níveis de prolina comparativamente ao tipo selvagem. Dentre dos eventos transgênicos o evento 14 apresentou maior conteúdo de prolina, sendo 24% maior que no tipo selvagem, (Figura 18, tabela 4 dos anexos).

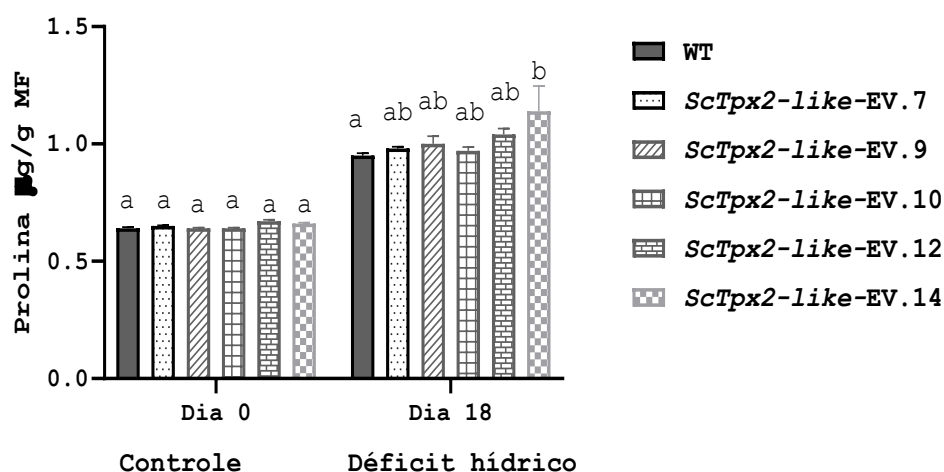


Figura 18. Avaliação do conteúdo de prolina. O conteúdo de prolina ($\mu\text{g/g MF}$) para os 5 eventos transgênicos com o gene *ScTpx2-like* e selvagem (WT) foi avaliado no dia 0 (controle, antes do déficit hídrico) e após 10 dias sob déficit hídrico com capacidade de 30% do vaso. Foi feita comparação múltipla de Tukey para cada dia. Letras diferentes em cada dia indicam diferença significativa entre as médias no nível ($P < 0,05$)

4.4.3 Peroxidação lipídica.

A peroxidação lipídica é um marcador bioquímico associado a múltiplos estresses, como por exemplo alta temperatura, estresse hídrico e salino (Morais et al., 2018). Todas as plantas submetidas ao déficit hídrico mostraram um aumento do conteúdo de MDA após 10 dias sob capacidade de vaso de 30% (Figura 19, tabela 5 anexos). As plantas de tipo selvagens apresentaram um aumento de 129% e as plantas dos 5 eventos que superexpressam o gene *Tpx2-like* variou entre 20% e 107%. Os eventos que apresentaram menor conteúdo de MDA foram os eventos 9 e 14 (Figura 19, tabela 5 anexos).

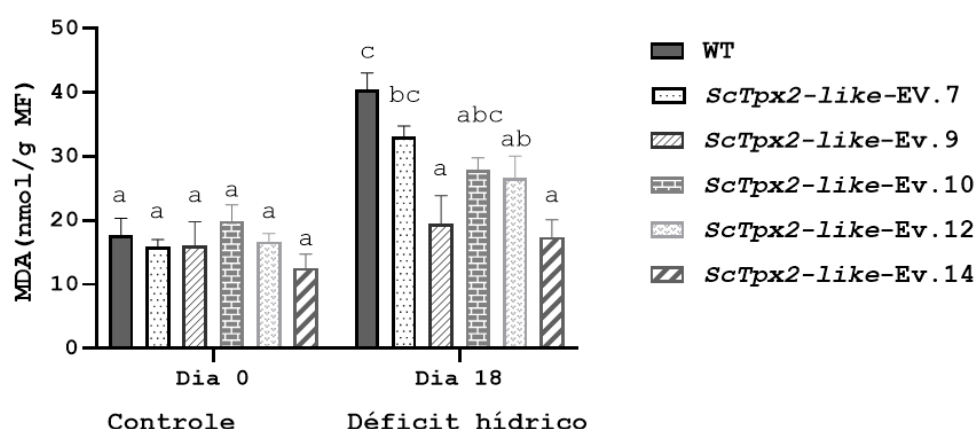


Figura 19. Análise da peroxidação de lipídeos. A peroxidação lipídica foi expressa através do conteúdo de MDA (nmol/g MF) para os 5 eventos transgênicos com o gene *ScTpx2-like* de cana-de-açúcar no dia 0 (controle) e após 10 dias de estresse hídrico a uma capacidade de 30% do vaso. Foi feita comparação múltipla de Tukey para cada dia. Letras diferentes em cada dia de amostragem indicam diferença significativa entre as médias no nível ($P < 0,05$)

5. Discussão

O déficit hídrico provoca alterações nos processos fisiológicos que impactam no desenvolvimento das plantas. Essa influência tem uma relação direta na resposta de troca gasosa da planta (Lawlor e Tezara.,2009). No presente estudo foi observado a redução da fotossíntese em todas as plantas submetidas ao déficit hídrico, cabendo destacar que nos eventos transgênicos que superexpressam o gene *ScTpx2-like* apresentaram eficiência significativa com respeito as plantas selvagens para se adaptar ao estresse hídrico. Silva et al., (2013), ao avaliarem dois genótipos de cana-de-açúcar, HoCP93-776 (suscetível à seca) e TCP02-4587 (tolerante à seca), observaram que o genótipo tolerante a seca apresentou eficiência fotossintética significativa sob déficit hídrico.

Dos Santos et al., (2019) ao Avaliarem seis variedades de cana de açúcar (SP79-1011, RB855113, RB92579, RB867515, RB72454 e RB855536) sob déficit hídrico observaram que em geral as variedades foram mais afetadas pela seca na fase de crescimento intenso. No entanto, as variedades RB867515 e RB92579 foram menos afetadas e mostraram capacidade significativa para se adaptar ao déficit hídrico. No presente trabalho as plantas foram submetidas ao déficit hídrico a os 4 meses de idade que corresponde a fase de crescimento inicial, nossos resultados mostram que as plantas que superexpressam o gene *ScTpx2-like* e selvagem foram afetadas. Porém, os eventos transgênicos mostraram em geral plasticidade fisiológica significativa durante o déficit hídrico e após a reidratação. Marchiori et al., 2017. Ao avaliarem dois genótipos de cana de açúcar (IACSP95-5000 e IACSP94-2094) na fase de crescimento inicial, observaram que os genótipos mostraram diferenças na plasticidade fisiológica e morfológica, sugerindo que a plasticidade fisiológica nessa etapa é de muita importância para a produtividade.

Graça et al., (2010) compararam a taxa fotossintética, condutância estomática e a transpiração de dois cultivares tolerantes à seca (SP83-2847 e CTC15) com um cultivar suscetível (SP86-155). Em resposta ao déficit hídrico, tanto a condutância estomática como a capacidade fotossintética foram afetadas em todas as plantas. Porém, foi observado um diferencial na adaptação ao déficit hídrico nos genótipos tolerantes à seca, que apresentaram maior taxa fotossintética que o genótipo suscetível. Neste trabalho foi observado que as plantas que superexpressam o gene *ScTpx2-like* apresentaram eficiência significativa para se adaptar ao déficit hídrico, pois a taxa fotossintética, a condutância estomática e a transpiração tiveram valores mais altos nas plantas com o gene *ScTpx2-like* do que nas plantas selvagens.

A recuperação da atividade fotossintética após a reidratação é variável de genótipo a genótipo e está relacionada aos mecanismos fisiológicos e moleculares das diferentes espécies de plantas (Chaves e Oliveira., 2004). Por exemplo, as plantas C4 apresentam maior eficiência no processo de fotorrespiração, uma vantagem sob as plantas C3 (Meacham-Hensold e Nguyen., 2020). A recuperação das plantas que superexpressam o gene *ScTpx2-like* e selvagem foi avaliada após 3 dias e 6 dias de reidratação. Nas plantas que superexpressam o gene *ScTpx2-like* a eficiência fotossintética foi significativamente maior que as do tipo selvagem tanto durante o déficit hídrico e como também após a reidratação.

O incremento de prolina tem sido relacionado com estresse hídrico. Diversas espécies apresentam variações do conteúdo de prolina em função da intensidade e do tempo do estresse hídrico, como observado em milho (Efeoglu et al., 2009) e trigo

(Nayyar e Walia, 2003). Em nosso estudo em cana de açúcar os resultados mostram que tanto em plantas selvagens como as que expressam *ScTpx2-like* há um incremento de prolina após os 10 dias submetidos a estresse hídrico. Porém, há uma clara tendência de maiores níveis em plantas transgênicas, que podem estar correlacionados a um menor dano causado pelo déficit hídrico.

Queiroz et al., (2011) avaliaram dois genótipos, IAC91-5155 e IAC91-2195, a capacidade hídrica de 55%, 40% e 25%. Os autores observaram que o conteúdo de prolina aumentou nos dias que as plantas foram submetidas ao estresse hídrico. No presente trabalho as plantas de cana foram submetidas a 30% de capacidade do vaso e observamos que o conteúdo de prolina aumentou tanto nas plantas transgênicas como nas plantas selvagens. Sawahel e Hassan (2002). Ao avaliarem plantas de trigo transgênicas com o gene P5CS' que codifica as enzimas necessárias para a biossíntese de prolina, observaram que a prolina aumentou em resposta ao estresse salino. De acordo com Molinari et al., (2007), ao avaliarem plantas de cana de açúcar superexpressando o gene P5CS sob déficit hídrico, observaram que os níveis de prolina aumentou e as plantas tiveram uma melhor resposta durante o déficit hídrico. Adicionalmente, nossos dados sugerem que a prolina durante o período de déficit hídrico protege as plantas do estresse oxidativo.

A peroxidação lipídica é um marcador de estresse oxidativo (Gratão et al., 2005). De acordo com Molinari et al., (2007) o teor de MDA está relacionado com a respostas das plantas ao estresse hídrico. Moraes et al., (2018) avaliaram seis genótipos de cana de açúcar (RB966928, RB98710, RB855453, RB99395, RB867515 e RB855156) submetidos, isoladamente, ao déficit hídrico, estresse por alta temperatura e estresse

salino. Os níveis de MDA aumentaram nos diferentes estresses que as plantas foram submetidas, o incremento do teor de MDA foi variável de genótipo a genótipo e tipo de estresse. O MDA também é aumentado em resposta a outros tipos de estresses, como o excesso de Cd. Zeng et al., (2017) avaliaram dois genótipos de cana de açúcar (HOCP07-613 e ROC22) submetidos ao estresse de cádmio (Cd). Os autores observaram um aumento do teor de MDA durante o estresse. Nós observamos que após 10 dias de déficit hídrico as plantas WT e transgênicas apresentaram um incremento de MDA. Porém, as plantas selvagens tiveram um maior conteúdo de MDA do que as plantas que superexpressam o gene *ScTpx2-like*. Esses dados sugerem que as plantas que superexpressam o gene *ScTpx2-like* estão experimentando menor estresse oxidativo.

6. Conclusões

As análises dos parâmetros fisiológicos avaliados nas plantas durante o déficit hídrico e na fase de reidratação mostraram que a superexpressão do gene *ScTpx2-like* tem um claro efeito positivo na fotossíntese e condutância estomática.

O conteúdo de prolina sob condições de déficit hídrico aumentou entre 50% e 72% nas plantas que superexpressam o gene *ScTpx2-like* e 48% nas plantas do tipo selvagem, sugerindo que as plantas transgênicas, ao sofrerem menos com o déficit hídrico, apresentam maior capacidade de produzir prolina, que atuaria protegendo as plantas do estresse oxidativo.

O teor de malondialdeído (MDA) nas plantas selvagens aumentou 129% e nas plantas que superexpressam o gene *ScTpx2-like* aumentou entre 20% e 107%, indicando que a proteína ScTpx2-like atua reduzindo o estresse oxidativo.

De acordo com nossos resultados, a superexpressão do gene *ScTpx2-like* tem potencial para o desenvolvimento de variedades de cana de açúcar tolerantes à seca, baseando-nos na capacidade que as plantas transgênicas mostraram para se adaptar ao déficit hídrico moderado.

7. Referências

- Augustine, S.M., Narayan, J.A., Syamaladevi, D.P., Appunu, C., Chakravarthi, M., Ravichandran, V., Subramonian, N. (2015a). *Erianthus arundinaceus* HSP70 (EaHSP70) overexpression increases drought and salinity tolerance in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid). *Plant Sci.* 232, 23–34. doi: 10.1016/j.plantsci.2014.12.012.
- Augustine, S.M., Narayan, J.A., Syamaladevi, D.P., Appunu, C., Chakravarthi, M., Ravichandran, V., Tuteja N., Subramonian N. (2015b). Introduction of Pea DNA Helicase 45 into Sugarcane (*Saccharum* spp. Hybrid) enhances cell membrane thermostability and upregulation of stress responsive genes leads to abiotic stress tolerance. *Mol. Biotechnol.* 57, 475–488. doi: 10.1007/s12033-015-9841-x.
- Andrei Smertenko, Shaun J Clare, Karl Effertz, Alyssa Parish, Austin Ross, Sharol Schmidt, (2021). A guide to plant TPX2-like and WAVE-DAMPENED2-like proteins, *Journal of Experimental Botany*, Volume 72, Issue 4, 24, Pages 1034–1045, <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa513>.
- Bates, L.S.; Waldren, R.P.; Teare, I.D. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and soil*, The Hague, v. 39, n. 1, p. 205-207.
- Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). Monitoramento agrícola – Cana-de-açúcar. v. 7- Safra 2020/21, n. 4 - Quarto levantamento, Brasília, p. 1-57 maio de 2021. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>.
- Cruz De Carvalho, M.H. (2008) Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling. *Plant Signaling & Behavior*, Georgetown, v.3, p. 156-165.
- Diniz AL, da Silva DIR, Lembke CG, Costa MD-BL, ten-Caten F, Li F, Vilela RD, Menossi M, Ware D, Endres L, Souza GM. (2020) Amino Acid and Carbohydrate Metabolism Are Coordinated to Maintain Energetic Balance during Drought in Sugarcane. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23):9124. <https://doi.org/10.3390/ijms21239124>.
- Dos Santos, C. M., Endres, L., da Silva, A. C. S., Silva, J. V., de Souza Barbosa, G. V., Froehlich, A., & Teixeira, M. M. (2019). Water Relations and Osmolyte Accumulation Related to Sugarcane Yield Under Drought Stress in a Tropical Climate. *International Journal of Plant Production*. doi:10.1007/s42106-019-00050-y.
- Du, P., Kumar, M., Yao, Y., Xie, Q., Wang, J., Zhang, B., ... Wu, A.-M. (2016). Genome-wide analysis of the TPX2 family proteins in *Eucalyptus grandis*. *BMC Genomics*, 17(1). doi:10.1186/s12864-016-3303-0.
- Efeoglu, B.; Ekmekçi, Y.; Çiçek, N. 2009. Physiological responses of three maize cultivars to drought stress and recovery. *South African Journal of Botany*, Pretoria, v. 75, n. 1, p. 34-42.

- Chaves, M.M. and Oliveira, M.M. (2004) Mechanisms Underlying Plant Resilience to Water Deficits: Prospects for Water-Saving Agriculture. *Journal of Experimental Botany*, 55, 2365-2384. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh269>.
- Evrard, J.L., Pieuchot, L., Vos, J.W., Vernos, I., Schmit, A.C. (2009). Plant TPX2 and related proteins. *Plant Signal Behav.* 4:69–72.
- Ferreira, T.H.S, Tsunada M.S., Bassi, D., Araújo P., Mattiello, L., Guidelli, G.V., Righetto, G.L., Gonçalves, V.R. Lakshmanan, P., Menossi, M. (2017). Sugarcane Water Stress Tolerance Mechanisms and Its Implications on Developing Biotechnology Solutions. *Frontiers in Plant Science* 8:1077.
- Food And Agriculture Organization of The United Nations. Food Outlook: biannual report on global food markets. Rome/ Italy, FAO, 2021. Disponivel em: <http://www.fao.org/documents/card/es/c/cb4479en/>.
- Gentile, A, Dias, L.I., Mattos, R.S., Ferreira, T.H., Menossi M. (2015) MicroRNAs and drought responses in sugarcane. *Frontiers in Plant Science*. 6:58.
- Guidelli, G.V., Mattiello, L, Gallinari, R.H., de Lucca, P.C., Menossi, M. (2018). pGVG: a new Gateway-compatible vector for transformation of sugarcane and other monocot crops. *Genetics and Molecular Biology*. 41:450-454.
- Gratão, P.L.; Polle, A.; LEA, P.J.; Azevedo, R.A. (2005). Making the life of heavy metalstressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*, Victoria, v. 32, p.481-494.
- Graça, José Perez da; Rodrigues, Fabiana Aparecida; Farias, José Renato Bouças; Oliveira, Maria Cristina Neves de; Hoffmann-Campo, Clara Beatriz; Zingaretti, Sonia Marli (2010). Physiological parameters in sugarcane cultivars submitted to water deficit. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 22(3), 189–197. doi:10.1590/S1677-04202010000300006.
- Gruss, O. J., Carazo-Salas, R. E., Schatz, C. A., Guarguaglini, G., Kast, J., Wilm, M., Mattaj, I. W. (2001). Ran Induces Spindle Assembly by Reversing the Inhibitory Effect of Importin α on TPX2 Activity. *Cell*, 104(1), 83–93. doi:10.1016/s0092-8674(01)00193-3
- Heath, R.L.; Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives in Biochemistry Biophysics*, New York, v. 125, n. 1, p. 189-198.
- Janmohamed, Azara & Thaunsukon, Prapimpuk & Shephard, Elizabeth & Phillips, Ian. (2006). Expression of recombinant flavin-containing monooxygenases in a baculovirus/insect cell system. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). 320. 39-59.
- Joanna Boruc, Xingguang Deng, Evelien Mylle, Nienke Besbrugge, Matthias Van Durme, Dmitri Demidov, Eva Dvořák Tomařtíková, Tong-Reen Connie Tan, Michaël Vandorpe, Dominique Eeckhout, Tom Beeckman, Moritz K. Nowack, Geert De Jaeger, Honghui Lin, Bo Liu, Daniël Van Damme, (2019). TPX2-LIKE PROTEIN3 Is the Primary Activator of α -Aurora Kinases and Is Essential for Embryogenesis, *Plant Physiology*, Volume 180, Issue 3, Pages 1389–1405, <https://doi.org/10.1104/pp.18.01515>

Katherine Meacham-Hensold and Amanda Nguyen (2020). The difference between C3 and C4 plants. Disponivel no URL: <https://ripe.illinois.edu/blog/difference-between-c3-and-c4-plants>.

King, M. R., & Petry, S. (2020). Phase separation of TPX2 enhances and spatially coordinates microtubule nucleation. *Nature Communications*, 11(1). doi:10.1038/s41467-019-14087-0

Kumar, A. (2016). Exploring RuBisCO Activase (Rca) Gene from Wheat for Augmenting Carbon Assimilatory Process under Heat Stress.

Lakshmanan, P., and Robinson, N. (2014). “Stress physiology: Abiotic stresses,” in *Sugarcane: Physiology, Biochemistry, and Functional Biology*, ed P. H. Moore and F. C. Botha (Chichester: John Wiley & Sons, Inc.), 411–434.

Livak KJ, Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods* 25, 402–408.

Marchiori PER, Machado EC, Sales CRG, Espinoza-Núñez E, Magalhães Filho JR, Souza GM, Pires RCM and Ribeiro RV (2017) Physiological Plasticity Is Important for Maintaining Sugarcane Growth under Water Deficit. *Front. Plant Sci.* 8:2148. doi: 10.3389/fpls.2017.02148

Molinari, H. B. C., Marur, C. J., Daros, E., De Campos, M. K. F., De Carvalho, J. F. R. P., Pereira, L. F. P., Vieira, L.G.E. (2007). Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum spp.*): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. *Physiol. Plant.* 130, 218–229

Morais, Marciana Bizerra de; Camara, Terezinha Rangel; Ulisses, Cláudia; Carvalho Filho, José Luiz Sandes; Willadino, Lilia (2018). *Multiple stresses on the oxidative metabolism of sugarcane varieties. Ciência Rural*, 48(4), doi:10.1590/0103-8478cr20141487

Moreira, J., Goswami, D., and Zhao, Y. (2007). “Bioenergy-successes and barriers,” in *Proceedings of Ises Solar World Congress 2007: Solar Energy and Human Settlement*, Vols I–V (Berlin; Heidelberg), 38–45.

Nakamura S, Mano S, Tanaka Y, Ohnishi M, Nakamori C, Araki M, Niwa , T, Nishimura M, Kaminaka H, Nakagawa T, Sato Y, Ishiguro S. (2010). Gateway binary vectors with the bialaphos resistance gene, bar, as a selection marker for plant transformation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74:1315-1319. <https://doi.org/10.1271/bbb.100184>.

Nayyar, H.; Walia, D.P (2003). Water stress induced proline accumulation in contrasting wheat genotypes as affected by calcium and abscisic acid. *Biologia Plantarum*, Praha, v. 46, n. 2, p. 275-279.

Neumayer, G., Helfricht, A., Shim, S. Y., Le, H. T., Lundin, C., Belzil, C., Nguyen, M. D. (2012). Targeting Protein for *Xenopus* Kinesin-like Protein 2 (TPX2) Regulates γ -Histone 2AX (γ -H2AX) Levels upon Ionizing Radiation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(50), 42206–42222. doi:10.1074/jbc.m112.385674.

- Lawlor, D. W. & Tezara, W. (2009). Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in waterdeficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. *Annals of Botany* 103, 561–579.
- Papini-Terzi F.S., Rocha, F.R., Venvio, R.Z.N., Felix, J.M., Vicentini, R., Ulian, E.C., Menossi, M., Souza, G.M. (2005). Transcription profiling of signal transduction-related genes in sugarcane tissues. *DNA Research* 12:27-38.
- Parry, M.A.J.; Habash, D.; Araus, J.L. (2004) Optimisation of water use by plants. *Annals of Applied Biology, Cambridge*, v. 144, n. 2, p. 125-126.
- Ramesh, P. (2000). Effect of different levels of drought during the formative phase on growth parameters and its relationship with dry matter accumulation in sugarcane. *J. Agron. Crop Sci.* 185, 83–89.
- Ramiro, D. A., Melotto-Passarin, D. M., Barbosa, M. d. A., Santos, F. d., Gomez, S. G. P., Massola Júnior, N. S., et al. (2016). Expression of Arabidopsis bax inhibitor-1 in transgenic sugarcane confers drought tolerance. *Plant Biotechnol. J.* 14, 1826–1837.
- Rafaela Josemara Barbosa Queiroz, Durvalina Maria Mathias dos Santos, Antonio Sergio Ferraudo, Samira Domingues Carlin, Marcelo de Almeida Silva (2011). *Plant Physiology and Biochemistry. Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)*, v.68, n.4, p.469-476.
- Robertson, M. J., Inmam-Bamber, N. G., Muchow, R. C., and Wood, A. W. (1999). Physiology and productivity of sugarcane with early and mid-season water deficit. *Field Crop Res.* 64, 211–227.
- Sawahel, W.A., Hassan, A.H. (2002). Generation of transgenic wheat plants producing high levels of the osmoprotectant proline. *Biotechnology Letters*, 24:721–725 <https://doi.org/10.1023/A:1015294319114>.
- Silva, Marcelo de Almeida; Jifon, John Lonfover; Santos, Claudiana Moura dos; Jadoski, Cleber Junior; Silva, Jorge Alberto Gonçalves da (2013). Photosynthetic capacity and water use efficiency in sugarcane genotypes subject to water deficit during early growth phase. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56:735–748. doi:10.1590/S1516-89132013000500004.
- Skirycz, A. Vandenbroucke, K., Clauw, P., Maleux, K., De Meyer, B., Dhondt, S., Pucci, A., Gonzalez, N., Hoeberichts, F., Tognetti, V.B., Galbiati, M., Tonelli, C., Van Breusegem, F., Vuylsteke, M., Inzé, D. (2011). Survival and growth of Arabidopsis plants given limited water are not equal. *Nature Biotechnology*, 29:212–214.
- Verslues, P.E.; Agarwal, M.; Katiyar-Agarwal, S.; Zhu, J.; Zhu, J.K.(2006) Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal, Oxford*, v. 45, n.4, p. 523–539.
- Walter, A., Galdos, M., Scarpore, F., Seabra, J., Leal, M., Cunha, M., et al. (2013). Brazilian sugarcane ethanol: developments so far and challenges for the future. *WIREs: Energy and Environment*, 3:70–92.

Zeng Q, Ling Q, Hu F, Wu J, Yang Z, Qi Y, Li Q. (2017) Genotypic Differences in Growth and Antioxidant Enzyme Activities Under Cadmium Stress in Sugarcane. *Bull Environ Contam Toxicol*. 99:607-613. doi: 10.1007/s00128-017-2185-4.

8. Anexos.

Tabela 1. Análise da taxa da fotossíntese, A ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) para os 5 eventos transgênicos que superexpressam o gene *ScTpx2-like* de cana-de-açúcar e plantas selvagens durante o período do experimento de estresse hídrico. Foi feita comparação múltipla de Tukey para cada dia. Letras diferentes em cada dia na coluna indicam diferença significativa entre as médias no nível ($P < 0,05$).

Gene/evento	100% capacidade do vaso	Déficit hídrico 30% de capacidade do vaso			Após reidratação	
	Dia 0	Dia 9	Dia 16	Dia 18	Dia 22	Dia 25
Selvagem (WT)	12,16 a	3,5 a	1,5 a	0,47 a	5,31 a	6,2 a
<i>ScTpx2-like</i> -EV.7	12,67 a	4,44 a	2,76 ab	2,98 b	8,5 ab	9,76 ab
<i>ScTpx2-like</i> -EV.9	14,37a	7,58 b	5,4 c	3,87 b	8,93 ab	14,15 b
<i>ScTpx2-like</i> -EV.10	15,09 ab	4,55 a	3,55 bc	2,36 b	8,79 ab	10,53 ab
<i>ScTpx2-like</i> -EV.12	17,58 b	5,58 ab	3,56 bc	2,89 b	11,5 b	14,5 8 b
<i>ScTpx2-like</i> -EV.14	13,98 a	5,66 ab	3,62 bc	2,47 b	9,56 ab	10,9 ab

Tabela 2. Avaliação da condutância estomática, Gs ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), para os 5 eventos transgênicos que superexpressam o gene *ScTpx2-like* de cana-de-açúcar e plantas selvagens, durante o período do experimento de estresse hídrico. Foi feita comparação múltipla de Tukey para cada dia. Letras diferentes em cada dia na coluna indicam diferença significativa entre as médias no nível ($P < 0,05$).

Gene/evento	100% capacidade do vaso	Déficit hídrico 30% de capacidade do vaso			Após reidratação	
	Dia 0	Dia 9	Dia 16	Dia 18	Dia 22	Dia 25
Selvagem (WT)	0,07 b	0,02 b	0,01b	0,01 b	0,05 a	0,06 ab
<i>ScTpx2-like</i> -EV.7	0,07 ab	0,02 b	0,02 ab	0,04 a	0,05 a	0,06 b
<i>ScTpx2-like</i> -EV.9	0,08 ab	0,04 ab	0,07 a	0,03 ab	0,06 a	0,08 ab
<i>ScTpx2-like</i> -EV.10	0,09 ab	0,08 a	0,02 ab	0,01 b	0,05 a	0,08 ab
<i>ScTpx2-like</i> -EV.12	0,1 ab	0,04 b	0,04 ab	0,03 ab	0,06 a	0,1 a
<i>ScTpx2-like</i> -EV.14	0,07 ab	0,04 b	0,04 ab	0,01 ab	0,05 a	0,1 ab

Tabela 3. Análise da taxa de transpiração, E ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$), para os 5 eventos transgênicos que superexpressam o gene *ScTpx2-like* de cana-de-açúcar e plantas selvagens durante o período do experimento de estresse hídrico. Foi feita comparação múltipla de Tukey para cada dia. Letras diferentes em cada dia na coluna indicam diferença significativa entre as médias no nível ($P < 0,05$).

Gene/evento	100% capacidade do vaso	Déficit hídrico 30% de capacidade do vaso			Após reidratação	
	Dia 0	Dia 9	Dia 16	Dia 18	Dia 22	Dia 25
Selvagem (WT)	1,95 b	0,81 b	0,57 b	0,3 b	1,29 a	1,43 a
<i>ScTpx2-like</i> -EV.7	1,99 b	0,78 b	0,68 b	1,06 a	1,29 a	1,44 a
<i>ScTpx2-like</i> -EV.9	2,31 ab	1,34 ab	1,82 a	0,93 ab	1,58 a	1,87 a
<i>ScTpx2-like</i> -EV.10	2,39 ab	2,1 a	0,82 ab	0,4 ab	1,47 a	1,82 a
<i>ScTpx2-like</i> -EV.12	2,69 a	1,2 ab	1,33 ab	0,73 ab	1,59 a	2,09 a
<i>ScTpx2-like</i> -EV.14	2,14 b	0,79 b	1,13 ab	0,55 ab	1,46 a	2,09 a

Tabela 4. Conteúdo de prolina ($\mu\text{g/g MF}$) para os 5 eventos transgênicos que superexpressam o gene *ScTpx2-like* de cana-de-açúcar no dia 0 (controle) e após 10 dias a capacidade de 30% do vaso. Foi feita comparação múltipla de Tukey para cada dia. Letras diferentes em cada dia na coluna indicam diferença significativa entre as médias no nível ($P < 0,05$).

Gene/evento	100% capacidade do vaso	Déficit hídrico 30% de capacidade do vaso
	Dia 0	Dia 18
Selvagem (WT)	0,64 a	0,95 a
<i>ScTpx2-like</i> -EV.7	0,65 a	0,98 ab
<i>ScTpx2-like</i> -EV.9	0,64 a	1,0 ab
<i>ScTpx2-like</i> -EV.10	0,64 a	0,97 ab
<i>ScTpx2-like</i> -EV.12	0,67 b	1,04 ab
<i>ScTpx2-like</i> -EV.14	0,66 ab	1,14 b

Tabela 5. A Peroxidação lipídica foi expressa através do conteúdo de MDA (nmol/g MF) para os 5 eventos transgênicos que superexpressam o gene *ScTpx2-like* de cana-de-açúcar no dia 0 (controle) e após 10 dias de estresse hídrico a uma capacidade de 30% do vaso. Foi feito comparação múltipla de Tukey para cada dia. Letras diferentes em cada dia na coluna indicam diferença significativa entre as médias no nível ($P < 0,05$).

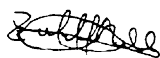
Gene/evento	100% capacidade do vaso	Déficit hídrico 30% de capacidade do vaso
	Dia 0	Dia 18
Selvagem (WT)	17,63 a	40,41 c
<i>ScTpx2-like</i> -EV.7	15,95 a	33,08 bc
<i>ScTpx2-like</i> -EV.9	16,16 a	19,45 a
<i>ScTpx2-like</i> -EV.10	19,95 a	27,92abc
<i>ScTpx2-like</i> -EV.12	16,71 a	26,7 ab
<i>ScTpx2-like</i> -EV.14	12,62 a	17,44 a

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Papel do gene *ScTpx2-like* na tolerância ao déficit hídrico na cana de açúcar**, não infringem os dispositivos da Lei nº 9.610/98; nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 19 de abril, 2022

Assinatura



Nome do(a) autor(a): Nery Tirabante Terrones

RNM nº F066246-4

Assinatura:



Nome do orientador: Marcelo Menossi Teixeira

RG nº 42.310.263

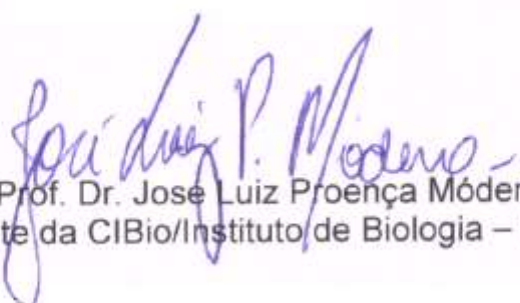


INFORMAÇÃO

INFORMAMOS que o projeto **CIBio/IB No. 2007/03 – “Genômica funcional de plantas”**, cujo pesquisador responsável é o Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira, sub-projeto “Role of the ScTpx2-like gene in water deficit tolerance in sugarcane”, da pós-graduanda Nery Tirabante Terrones, encontra-se devidamente aprovado e regularizado junto a CIBio/IB-UNICAMP e a CTNBio, conforme legislação vigente. O professor responsável se compromete a incluir o nome da aluna no próximo relatório da CIBio/IB/Unicamp em dezembro 2020.

Cidade Universitária “Zeferino Vaz”,

16 de junho de 2020.



Prof. Dr. José Luiz Proença Modena
Presidente da CIBio/Instituto de Biologia – UNICAMP