



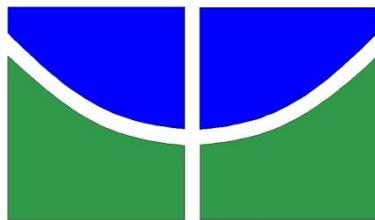
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE TRÊS GENES
QUE CODIFICAM A ENZIMA ESTILBENE SINTASE ISOLADOS DE
Arachis spp.**

Larissa Boaz de Lima

Brasília, 12 de setembro de 2024

FACULDADE DE TECNOLOGIA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL

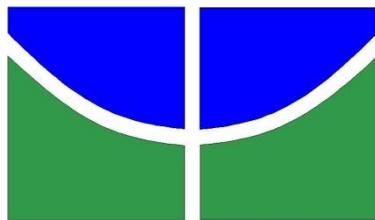
**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE TRÊS GENES
QUE CODIFICAM A ENZIMA ESTILBENE SINTASE ISOLADOS DE
Arachis spp.**

Larissa Boaz de Lima

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação
apresentado ao Departamento de Engenharia
Florestal da Universidade de Brasília como parte
das exigências para obtenção do título de Bacharel
em Engenharia Florestal.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Marcos de Souza
Coorientadora: Dra. Ana Cristina Miranda
Brasileiro

Brasília-DF, 12 de setembro de 2024



Universidade de Brasília - UnB
Faculdade de Tecnologia - FT
Departamento de Engenharia Florestal – EFL

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE TRÊS GENES
QUE CODIFICAM A ENZIMA ESTILBENE SINTASE ISOLADOS DE
*Arachis spp.***

Estudante: Larissa Boaz de Lima

Matrícula: 18/0021575

Orientador: Prof. Dr. Anderson Marcos de Souza

Menção: _____

Prof. Dr. Anderson Marcos de Souza
Universidade de Brasília – UnB
Departamento de Engenharia Florestal
Orientador (EFL)

Prof. Dra. Juscelina Arcanjo dos Santos
Universidade de Brasília – UnB
Membro da Banca (EFL)

Dr. Cristiano Lacorte
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - CENARGEN
Membro da Banca

Brasília-DF, 12 de setembro de 2024

FICHA CATALOGRÁFICA

DE LIMA, LARISSA BOAZ

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE TRÊS GENES QUE CODIFICAM A ENZIMA ESTILBENE SINTASE ISOLADOS DE *Arachis* spp.

xx p., 210 x 297mm (EFL/FT/UnB, Engenheira, Engenharia Florestal, 2024).

Trabalho de conclusão de curso - Universidade de Brasília, Faculdade de Tecnologia.

Departamento de Engenharia Florestal

- | | |
|-------------------------|--------------------|
| 1. Expressão transiente | 2. Agroinfiltração |
| 3. Resveratrol | 4. Gene STS |
| I. EFL/FT/UnB | II. Título (série) |

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

DE LIMA, L. B. (2024). **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE TRÊS GENES QUE CODIFICAM A ENZIMA ESTILBENE SINTASE ISOLADOS DE ESPÉCIES SILVESTRES DE *Arachis* spp..** Trabalho de conclusão de curso, Departamento de Engenharia Florestal, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 36 p.

CESSÃO DE DIREITOS

AUTOR(A): Larissa Boaz de Lima

TÍTULO: *AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE TRÊS GENES QUE CODIFICAM A ENZIMA ESTILBENE SINTASE ISOLADOS DE ESPÉCIES SILVESTRES DE *Arachis* spp..*

GRAU: Engenheiro(a) Florestal

ANO: 2024

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias deste Projeto Final de Graduação e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. A autora reserva outros direitos de publicação e nenhuma parte deste Projeto Final de Graduação pode ser reproduzida sem autorização por escrito do autor.

Larissa Boaz de Lima

larissaboaz@hotmail.com

À minha família.

AGRADECIMENTOS

A Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e INCT Biotec Seca-Pragas que financiaram o desenvolvimento do meu projeto de pesquisa.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Anderson Marcos e Dra. Ana Cristina Brasileiro pela colaboração no trabalho, admiro grandemente ambos na área de melhoramento e considero um privilégio ter desenvolvido ciência em conjunto com eles. Ao Dr. Cristiano Lacorte e a Dra. Patrícia Guimarães por terem contribuído ao longo da minha Iniciação Científica e ao Prof. Dr. Fabian Borghetti por ter sido meu primeiro orientador e o responsável por me despertar interesse pela pesquisa em botânica e enfrentamento às Mudanças Climáticas, sempre com muita paciência e disponibilidade para debater os mais variados assuntos.

Aos meus colegas do laboratório de interação molecular planta-praga III (LPPIII) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, que contribuíram não só com esse trabalho, mas também com a minha formação. Em especial ao Dr. Hugo Teixeira por sempre me incentivar e apoiar no que eu precisasse, com muito bom humor, alegrando meus dias no laboratório, à Bruna Medeiros por ter sido uma parceira impecável em todos os momentos, me dando apoio tanto em aspectos profissionais como pessoais e sendo realmente uma grande inspiração profissional e de ser humano e ao Dr. Adrien Speck pela troca de ideias e incentivo à pesquisa.

A todos os professores que passaram pela minha trajetória, desde a escola até a graduação, sempre contribuindo com o meu desenvolvimento e me inspirando a buscar conhecimento. Em especial ao Dr. Reuber Brandão, ao Daniel Escobar, a Marine Binda e ao Renato Miletti, professores a quem lembrarei eternamente com muito carinho. Igualmente, a todos amigos que fiz durante esses anos, Maria Luiza Escobar, Júlia Brito, Júlia Porfírio, Ana Luísa Machado, Aline Cristine, Gabriel Elias Macedo, Joelma Costa, Carla Caroline, Luiza Lopes, Jarllys Teixeira, Patrick Mendes e Renan Miguel, foram a melhor parte dessa trajetória.

À minha família que desde criança me incentivou e deu todo suporte necessário para que eu pudesse desenvolver minha criatividade em todas as minhas empreitadas, fosse em aulas de karatê, de piano ou de italiano. Serei eternamente grata por todo amor que me foi dado, porque sei que sem isso eu não teria sido capaz de chegar até aqui. Agradeço aos meus pais, Silvia Boaz e Ricardo Faria, e à minha irmã, Laís Boaz, por ter me ajudado em tanto e não desistido de mim, mesmo que muitas vezes eu mesma duvidasse da minha capacidade.

*“Para honrar quem lenha pra tua fornalha foi,
Lenha pra tua fogueira eu serei.” (El Efecto)*

RESUMO

de Lima, Larissa Boaz (DE LIMA, L. B.) **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE TRÊS GENES QUE CODIFICAM A ENZIMA ESTILBENE SINTASE ISOLADOS DE ESPÉCIES SILVESTRES DE *Arachis* spp.**. Monografia (Bacharelado em Engenharia Florestal) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

A expressão transiente é a expressão temporária de um transgene, sendo uma forma de transformação genética rápida e de baixo custo. Dessa forma, a agroinfiltração é uma das abordagens mais usadas para a detecção da expressão transiente em plantas e consiste na infiltração de tecidos foliares com *Agrobacterium* spp.. O gene STS codifica a enzima Estilbeno Sintase responsável pela síntese do resveratrol que é um poderoso antioxidante encontrado em um número limitado de plantas, incluindo espécies silvestres do gênero *Arachis*, as quais são nativas brasileiras. Esse gene é relacionado com a reação da planta a diferentes estresses ambientais bióticos, como a alguns dos principais fungos causadores de doenças, como os do gênero *Sclerotinia*. Utilizando a metodologia da agroinfiltração o objetivo do trabalho é determinar a eficiência da metodologia em permitir a avaliação da expressão de um transgene de interesse em folhas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas com três construções contendo distintos genes STS oriundos de três espécies de *Arachis* e compará-las com as construções controle (vetor empty, *mock* com solução de cloreto de magnésio e amostra de amendoim induzidos por luz UV). Para isso, sementes de *N. benthamiana* foram germinadas em substrato e crescidas em sala de cultura sob condições controladas. Duas semanas após a semeadura, as plântulas foram transplantadas para recipientes plásticos contendo solo estéril e transferidas para casa de vegetação. *Agrobacterium tumefaciens* ‘GV30101’ transformada com cada um dos genes *Assts2*, *Aists3* e *Acsts4* ou *gfp* (*Green Fluorescent Protein*), foram cultivadas em meio LB líquido e posteriormente infiltradas em folhas de *N. benthamiana* por meio da câmara de vácuo do acelerador de micropartículas, utilizado para que a infiltração ocorresse em todas as folhas de forma uniforme. Posteriormente, as folhas foram avaliadas em microscópio com filtro UV quanto à expressão de *gfp*. Dessa forma, a expressão transiente do gene *gfp*, 3 dias após a agroinfiltração, se mostrou eficiente como indicador da expressão temporária dos três genes STS que estavam no mesmo vetor pPZP além de representar de forma concreta um meio de valorização da biodiversidade brasileira.

Palavras-chave: Expressão transiente; Agroinfiltração; Resveratrol; *Agrobacterium tumefaciens*; gene STS; gênero *Arachis*; Biodiversidade.

ABSTRACT

de Lima, Larissa Boaz (DE LIMA, L. B.) **EVALUATION OF THE BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF THREE GENES THAT ENCODE THE ENZYME STILBENE SINTASE ISOLATED FROM WILD SPECIES OF *Arachis* spp.**. Monograph (Forest Engineering Degree) – University of Brasília, Brasília, DF.

Transient expression is the temporary expression of a transgene, being a form of rapid and low-cost genetic transformation. Thus, agroinfiltration is one of the most used approaches for the detection of transient expression in plants and consists in the infiltration of leaf tissues with *Agrobacterium* spp.. The STS gene encodes the enzyme Stilbeno Synthase responsible for the synthesis of resveratrol, which is a powerful antioxidant found in a limited number of plants, including wild species of the genus *Arachis*, which are native to Brazil. This gene is related to the plant's reaction to different biotic environmental stresses, such as some of the main disease-causing fungi, such as those of the genus *Sclerotinia*. Using the methodology of agroinfiltration the objective of this work is to determine the efficiency of the methodology in allowing the evaluation of the expression of a transgene of interest in *Nicotiana benthamiana* agroinfiltrated leaves with three constructions containing different STS genes from three species of *Arachis* and compare them with the control constructions (empty vector, mock with magnesium chloride solution and peanut sample induced by UV light). For this, seeds of *N. benthamiana* were germinated in substrate and grown in culture room under controlled conditions. Two weeks after sowing, the seedlings were transplanted into plastic containers containing sterile soil and transferred to the greenhouse. *Agrobacterium tumefaciens* 'GV30101' transformed with each one of the genes *Assts2*, *Aists3* and *Acsts4* or *gfp* (Green Fluorescent Protein), were grown in liquid LB medium and then infiltrated into *N. benthamiana* leaves through the microparticle accelerator vacuum chamber, used so that the infiltration occurred in all leaves evenly. Subsequently, the leaves were evaluated in microscope with UV filter for *gfp* expression. Thus, the transient expression of the *gfp* gene, 3 days after agroinfiltration, was efficient as an indicator of the temporary expression of the three STS genes that were in the same pPZP vector and represents a concrete way of valuing Brazilian biodiversity.

Keywords: Transient expression; Agroinfiltration; Resveratrol; *Agrobacterium tumefaciens*; *sts* gene; *Arachis* genus; Biodiversity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa do vetor binário pPZP-AsSTS2 (Chu et al., 2014) contendo o gene *Assts2* oriundo de *Arachis stenosperma* e o gene *gfp* (*Green Fluorescent Protein*). Fonte: Snapgene® software (2024)17
- Figura 2.** Mapa do vetor binário pPZP-AiSTS3 (Chu et al., 2014) contendo o gene *Aists3* oriundo de *Arachis stenosperma* e o gene *gfp* (*Green Fluorescent Protein*). Fonte: Snapgene® software (2024). 19
- Figura 3.** Mapa do vetor binário pPZP-AcSTS4 (Chu et al., 2014) contendo o gene *Acsts4* oriundo de *Arachis stenosperma* e o gene *gfp* (*Green Fluorescent Protein*). Fonte: Snapgene® software (2024). 20
- Figura 4.** Mapa do vetor binário pPZP-empty (Chu et al., 2014) contendo apenas o gene *gfp* (*Green Fluorescent Protein*). Fonte: Snapgene® software (2024). 20
- Figura 5.** Montagem do material vegetal para agroinfiltração. 21
- Figura 6.** Câmara de vácuo utilizado na agroinfiltração. 22
- Figura 7.** Momento da agroinfiltração, sendo a (A) antes da aplicação do vácuo e (B) depois.22
- Figura 8.** Visualização da expressão de *gfp* em folhas de *N. benthamiana* três dias após a agroinfiltração. 23
- Figura 9.** Plântulas de *N. benthamiana* sete dias após a germinação. 25
- Figura 10.** Plantas de *N. benthamiana* com cerca de 45 dias de idade, no dia da agroinfiltração. 25
- Figura 11.** Sedimento bacteriano formado após centrifugação. 26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Peso úmido antes da liofilização e peso seco após a liofilização, e as respectivas porcentagens perdas de água, das 14 amostras de folhas de <i>N. benthamiana</i> liofilizadas.	28
Tabela 2. Correlação de Pearson entre peso fresco (g), peso seco (g) e perda de água (%).	29
Tabela 3. Quantificação do resveratrol por amostra.	29
Tabela 4. ANOVA quantificação do resveratrol por amostra.	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NBT/NTM	<i>New Breeding Technologies</i> (en)/ Novas Tecnologias de Melhoramento (pt)
nm	Nanômetros
PGM	Planta Geneticamente Modificada
rpm	Rotações por minuto
UE	União Européia
WT	<i>Wild-type</i> (en) / Tipo silvestre (pt), a forma típica da espécie

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	14
2.2 Objetivos específicos.	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 Expressão transiente;	15
3.2 Agroinfiltração;	15
3.3 Genes <i>sts</i> e resveratrol;	16
4 MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 Material vegetal;	18
4.2 Preparo das construções de <i>Agrobacterium</i> ;	18
4.3 Ensaios de agroinfiltração;	21
4.4 Análise da expressão transiente de GFP;	23
4.5 Liofilização do material;	23
4.6 Quantificação de resveratrol.	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 Germinação da planta modelo;	25
5.2 Cultivo de <i>Agrobacterium tumefascien</i> ;	26
5.3 Eficiência de transformação;	26
5.6 Liofilização;	27
5.7 Quantificação de resveratrol.	29

6 CONCLUSÕES	31
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS	33

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um país com biodiversidade extremamente rica e grande representação do agronegócio no PIB, possuindo assim um enorme potencial para aplicação da tecnologia de transgenia em programas de melhoramento genético.

O avanço da pesquisa e do desenvolvimento tecnológico na área da biotecnologia e a ampla utilização de plantas geneticamente modificadas (PGMs) trouxeram diversas vantagens para produção agrícola brasileira, dentre elas: expressiva redução na dependência de utilização de insumos, rápida obtenção de genótipos apropriados às demandas requeridas, redução de custos com melhoria da qualidade na produção agrícola e aumento da variabilidade genética de grandes culturas (Celso & Valois, 2001). Dessa forma, por mais que o debate sobre a segurança de produtos derivados e PGMs no mercado consumidor seja ainda persista, é evidente o quanto a tecnologia dos transgênicos é impactante, principalmente para a segurança alimentar e econômica brasileira (ISAAA Inc., 2024).

Em relação à biossegurança, desde o ano de 1994, nos Estados Unidos, foram produzidas evidências científicas suficientes para liberação do primeiro produto alimentício derivado de PGMs no mercado consumidor. No Brasil, a Lei de Biossegurança, promulgada em 2005, é amplamente reconhecida a nível internacional como um dos processos regulatórios mais rigorosos e abrangentes globalmente. Isso garante que a pesquisa com PGMs, além de sua inserção no mercado consumidor, seja extremamente segura e confiável.

Diante do exposto, pode-se afirmar que com o desenvolvimento da pesquisa e do uso da transgenia no melhoramento vegetal, continuarão sendo encontradas soluções, não somente de garantir o crescimento e a intensificação da produção agrícola brasileira de forma sustentável, como também, de estabelecer sistemas de produção adaptados às demandas atuais referentes tanto a pautas ambientais, como pautas sociais (Naves et al., 2024). A transformação genética de plantas, assim como outras biotecnologias, é uma ferramenta que hoje faz parte da maioria dos programas de melhoramento genético. A partir desta, é possível realizar a inserção controlada de alelos para a modulação de características de interesse, como maior produtividade e resistência a patógenos (Naves et al., 2024).

No melhoramento genético, a principal perspectiva para um futuro próximo é contribuir para a diminuição da pressão sobre os recursos naturais. Uma das estratégias para atingir tal

objetivo é o desenvolvimento de tecnologias que permitam o incremento da eficiência de produção de fibras e alimentos, além da preservação do bom funcionamento dos serviços ecossistêmicos.

O desenvolvimento da biotecnologia agrícola e a utilização de técnicas como as NBTs (*New Breeding Technologies*) ou NTMs (Novas Tecnologias de Melhoramento) podem auxiliar neste avanço. NBTs é um termo cunhado pela UE para se referir a técnicas de engenharia genética mais modernas, diferentes dos métodos atuais de modificação genética de culturas comerciais (Dias et al, 2017). Algumas destas novas técnicas em desenvolvimento incluem metilação de DNA dependente de RNA, enxertia em culturas transgênicas, melhoramento reverso e agroinfiltração (Plants for the future, 2014). Essas técnicas podem contribuir positivamente na mitigação dos efeitos ambientais das mudanças climáticas e, concomitantemente, assegurar a segurança alimentar e a segurança econômica de países com forte participação do setor agrícola na economia, como é o caso do Brasil, a partir de produções agrícolas com alto valor agregado. É importante ressaltar que já existem processos regulatórios de biossegurança para NTMs em andamento na América Latina (Rosado & Eriksson, 2022).

A expressão transiente é um tipo de expressão gênica heteróloga, sem integração do DNA ao genoma da planta (Lacorte & Ribeiro, 2015) e, conseqüentemente, sem a passagem do gene para as linhagens futuras. Uma das principais aplicações dessa ferramenta experimental é analisar se a expressão ou o silenciamento de um gene de interesse é funcional, em um curto período, e com um baixo custo, além da possibilidade de produção de macromoléculas recombinantes com alta eficiência e em larga escala (Fischer et al., 1999 Tyurinet al. 2020.).

A agroinfiltração, uma das técnicas de expressão gênica transiente, é considerada uma NTM pois pode ser utilizada para a produção em plantas, de forma transiente, de biofármacos e moléculas terapêuticas (Ricroch et al. 2022). Em particular, uma vacina contra a gripe teve resultados promissores quando produzida em plantas de *Nicotiana benthamiana*, a espécie de escolha para expressar genes de forma transiente por agroinfiltração foliar (Margolin et al. 2018), por ser a espécie modelo para ensaios de agroinfiltração, devido à sua morfologia: folhas mais maleáveis e sem pilosidade ou qualquer revestimento que dificulte a penetração do tampão de infiltração nos tecidos foliares, de forma a infiltração do tampão ocorra de forma mais homogênea no tecido foliar.

O gene *sts* está relacionado com a produção de resveratrol e é encontrado em um número limitado de espécies, sendo algumas delas nativas da América do Sul e do Brasil, do gênero *Arachis*. Estas desenvolveram traços de adaptação associados a defesa e tolerância a estresse bióticos e abióticos, dentre as quais está a produção de fitoalexinas como o resveratrol (Carvalho et al., 2020). Além disso, existe um robusto banco de germoplasma estabelecido pelo pesquisador José Francisco Valls na Embrapa CENARGEN, o que permitiu que o grupo de pesquisa do laboratório de interação molecular planta-praga III (LPPIII) produzisse uma vasta pesquisa acerca de genes do gênero *Arachis* e suas funções. A partir dessas pesquisas, se torna evidente o potencial de contribuição de espécies silvestres brasileira para PGMs e, nesse caso, especialmente para o mercado farmacológico, de modo a valorizar a biodiversidade brasileira e estimulando a produção de novas pesquisas acerca de outras espécies nativas.

Diante do exposto, o seguinte trabalho apresenta a proposta de avaliar o potencial biotecnológico da técnica de agroinfiltração utilizando genes *sts* isolados de espécies silvestres de *Arachis* para produção rápida e com baixo custo de resveratrol. A partir deste, espera-se que a técnica seja valorizada como potencial forma de análise da expressão de genes, de modo a contribuir para PGMs e para o estímulo de criação de novos negócios na área de produção de macromoléculas por meio de biofábricas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial biotecnológico de três genes que codificam para a enzima Estilbene Sintase (STS) isolados de três espécies silvestres de *Arachis* spp. por meio da técnica de agroinfiltração.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar um ensaio de agroinfiltração em folhas *Nicotiana benthamiana* com *Agrobacterium tumefaciens* contendo vetores binários com três genes *sts* oriundos de três espécies de *Arachis*: *A. stenosperma* (*Assts2*), *A. ipaënsis* (*Aists3*) e *A. cardenasii* (*Acsts4*) e o vetor vazio (*empty*);
- Avaliar a eficiência de transformação por agroinfiltração pela visualização da expressão do gene *gfp* ('*Green Fluorescent Protein*');
- Quantificar o conteúdo de resveratrol em três pools (repetições biológicas) de folhas para cada uma das três construções agroinfiltradas (*Assts2*; *Aists3*; *Acsts4*; e vetor *empty*).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Expressão transiente

A expressão transiente é um tipo de expressão gênica temporária, ou seja, em que os genes heterólogos introduzidos não são transmitidos para as próximas gerações do organismo transformado. Existem várias formas de induzir a expressão transiente de um gene: por métodos diretos de transformação, como por exemplo, a transformação de protoplastos e a biobalística, por vetores virais ou por infiltração de linhagens desarmadas de *Agrobacterium tumefaciens*.

A maior contribuição da expressão transiente em relação à transformação estável, para o estudo e a caracterização de vários fatores relacionados com a expressão heteróloga de genes, é a rápida produção de grandes quantidades de proteína. Com isso, técnicas de expressão transiente permitem a diminuição dos custos financeiros e de tempo. Além disso, são relativamente mais simples, com menos etapas nos protocolos, não sendo necessárias as etapas de seleção e regeneração em cultura de tecidos, juntamente com as análises e caracterização dos eventos de transformação estáveis (Lacorte & Ribeiro, 2015).

Uma das aplicações mais interessantes e vantajosas da técnica de expressão transiente é para a produção de proteínas heterólogas em plantas. Contudo, muitas vezes não é simples estabelecer um protocolo economicamente viável que permita a produção em larga escala de proteínas em plantas (Streatfield, 2007). Dessa forma, são necessárias mais pesquisas visando o aumento da expressão das proteínas de interesse com alto nível de pureza, em larga escala e com custos reduzidos, sendo um potencial alternativa a expressão transiente, pois é uma técnica simples, sem necessidade de grandes investimentos em materiais e infraestrutura (Pogue et al., 2010).

3.2 Agroinfiltração

A agroinfiltração é uma técnica de expressão transiente que consiste na infiltração de tecidos foliares com um tampão de infiltração contendo *Agrobacterium tumefaciens*. (Fischer et al., 1999). A infiltração pode se dar por meio de vácuo ou manualmente por meio de uma seringa. Durante a agroinfiltração, praticamente todas as células do tecido foliar em contato com o tampão são transformadas pela agrobactéria e o gene de interesse contido no vetor binário

é transferido para as células vegetais e integrado em seu núcleo. Todavia, esses estudos ainda são considerados inconclusivos devido à complexidade da interação agrobactéria-célula.

Três a quatro dias após a infiltração, a quantidade de proteínas heterólogas de interesse expressas é suficiente para sua detecção ou visualização, como por exemplo para a proteína verde-fluorescente GFP, assim como para purificação e extração de macromoléculas, em pequena ou média escala (Lacorte & Ribeiro, 2015).

Atualmente são reconhecidas diversas contribuições da agroinfiltração em conjunto com as outras técnicas NTMs, tanto no campo de edição genética, quanto na produção de produtos com alto valor agregado com fins terapêuticos e industriais, por exemplo, produção de macromoléculas farmacológicas e no estudo de potenciais genes úteis na remediação de problemas na produção agrícola, como ataque de patógenos e seca (Ricroch, 2022).

3.3 Genes *sts* e resveratrol

O gene *sts* codifica a enzima Estilbeno Sintase, responsável pela síntese do resveratrol, um antioxidante raramente encontrado em espécies vegetais, sendo algumas destas as espécies silvestres do gênero *Arachis*, nativas do Brasil (Brasileiro et al., 2023).

Genes *sts* foram identificados em espécies naturalmente produtoras de resveratrol, tais como a videira (*Vitis* spp.), o amendoim (*Arachis* spp.) e *Polygonum-cuspidatum* (Chialva et al., 2018). Por meio de estudos transcritômicos e genômicos da equipe *Arachis* da Embrapa, foi possível identificar genes *sts* em diversas espécies silvestres de *Arachis* spp., o que permitiu associar a expressão desses genes à resposta a uma variedade de estresses bióticos e abióticos (Guimarães et al., 2012; Brasileiro et al. 2015; Guimaraes et al. 2015; Vinson et al., 2018). Esses estudos sugerem que os genes *sts* de *Arachis* podem ser explorados como alelos de interesse a serem transferidos para outras espécies vegetais não-produtoras de resveratrol via transgenia para a obtenção e o desenvolvimento futura de culturas mais adaptadas às mudanças climáticas.

Ademais, a expressão ectópica de genes *sts* isolados de outras espécies vegetais produtoras de resveratrol tem sido associada à resistência a diversos fungos patogênicos, incluindo os gêneros *Sclerotinia*, *Botrytis*, *Oidium*, *Puccinia* e *Magnaporthe* (Lygin et al.,

2014). Plantas transgênicas superexpressando genes *sts* também podem apresentar maior resistência a outros fitopatógenos, como bactérias e nematoides, uma vez que o resveratrol atua como uma fitoalexina, mediando a ativação do sistema de defesa da planta e contribuindo para respostas sistêmicas a estresses bióticos (Bostanghadiri et al., 2017). O resveratrol também possui propriedades antivirais e tem sido explorado no controle de vírus que afetam tanto plantas quanto humanos, incluindo Covid-19, HIV, Influenza e HSV-2 (Filardo et al., 2020).

Além do seu uso para a obtenção de culturas mais tolerantes/resistentes a diversos estresses bióticos e abióticos, PGMs têm sido utilizadas como biofábricas para a produção de resveratrol. O tabaco (*Nicotiana tabacum*), devido à sua notável capacidade de produção de biomassa foliar (Jeong et al., 2016), e tem sido utilizada como a espécie modelo para a bioprodução de resveratrol. Assim, a superexpressão de genes *sts* oriundos de espécies silvestres de *Arachis* tem um potencial considerável para alcançar altos níveis deste metabólito em PGMs de tabaco. Em paralelo, a expressão transiente de genes *sts* oriundos de espécies silvestres de *Arachis* por agroinfiltração em folhas de *Nicotiana benthamiana* também surge como uma alternativa viável e eficiente para a produção acelerada de resveratrol.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Aproximadamente 70 sementes de *Nicotiana benthamiana*, espécie modelo para esta metodologia (Lacorte & Ribeiro, 2015), por demandarem um cultivo simples e terem as folhas mais maleáveis, o que reduz a resistência para a infiltração do tampão por meio de vácuo. As sementes foram dispersas em substrato (Carolina padrão, Carolina Soil, Brasil) e cultivadas em sala de cultura sob condições controladas de crescimento (25 ± 2 °C; 12 horas de fotoperíodo; $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ de intensidade de luz). Três semanas após o plantio, 30 plântulas foram transplantadas para recipientes plásticos de 350 mL contendo solo autoclavado e transferidas para casa de vegetação.

4.2. Preparo das construções de *Agrobacterium*

Uma colônia de *Agrobacterium tumefaciens* da linhagem desarmada ‘GV30101’ previamente armazenada em congelador a -80C° e transformada com o vetor binário pPZP contendo (vetor vazio) ou cada um dos três genes *sts*, foi inoculada em 10 mililitros de meio LB líquido e cultivada a 28 °C e 150 rpm, por 48 horas. Em seguida, 10 μL deste pré-inóculo foram adicionados a 200 mililitros de meio LB líquido e cultivados a 28 °C e 150 rpm, por 24 horas adicionais. Cada construção continha um dos seguintes vetores binários (Chu et al., 2014):

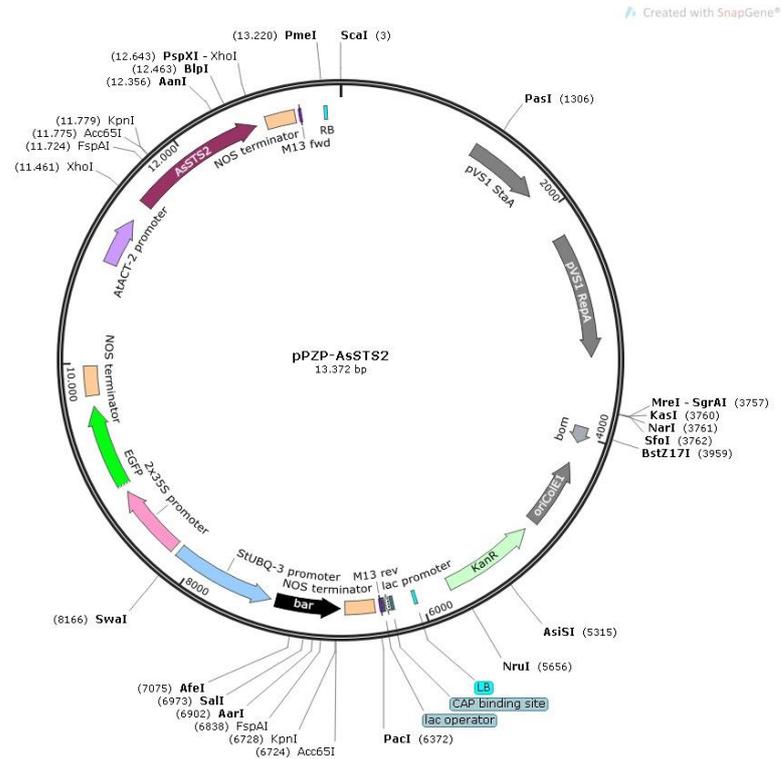


Figura 1. Mapa do vetor binário pPZP-AsSTS2 (Chu et al., 2014) contendo o gene *Assts2* oriundo de *Arachis stenosperma* e o gene *gfp* (*Green Fluorescent Protein*). Fonte: Snapgene® software (2024).

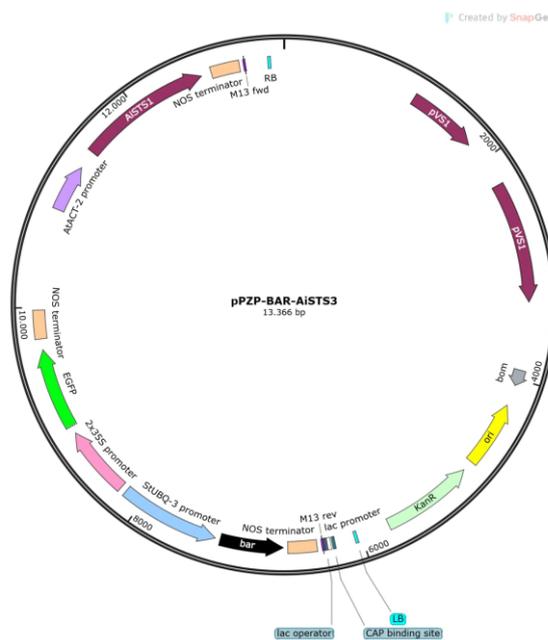


Figura 2. Mapa do vetor binário pPZP-AiSTS3 (Chu et al., 2014) contendo o gene *Aists3* oriundo de *Arachis stenosperma* e o gene *gfp* (*Green Fluorescent Protein*). Fonte: Snapgene® software (2024).

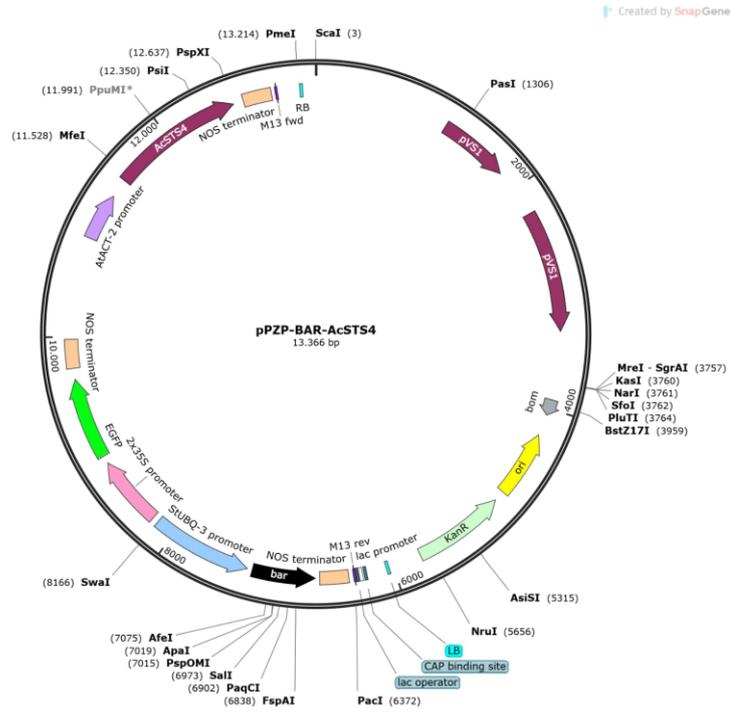


Figura 3. Mapa do vetor binário pPZP-AcSTS4 (Chu et al., 2014) contendo o gene *Acsts4* oriundo de *Arachis stenosperma* e o gene *gfp* (*Green Fluorescent Protein*). Fonte: Snapgene® software (2024).

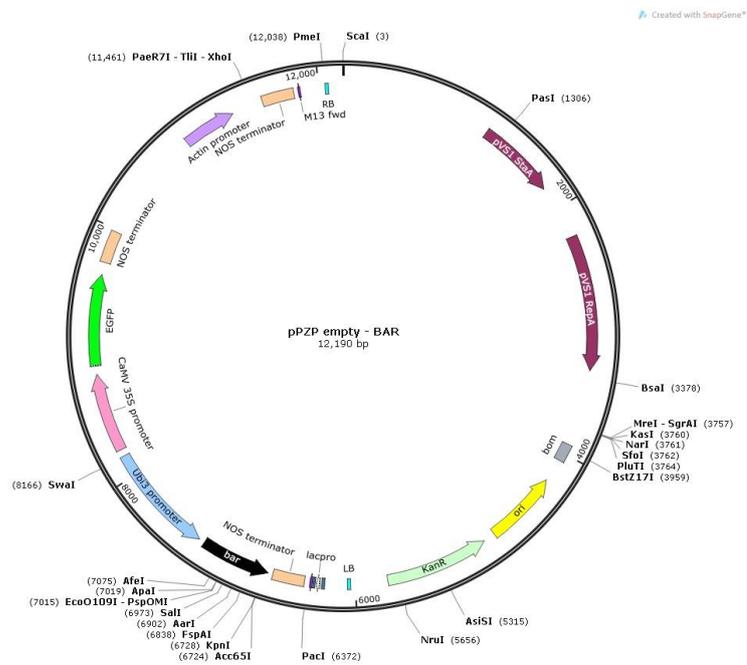


Figura 4. Mapa do vetor binário pPZP-empty (Chu et al., 2014) contendo apenas o gene *gfp* (*Green Fluorescent Protein*). Fonte: Snapgene® software (2024).

Após 24 horas de crescimento, as culturas de *A. tumefaciens* foram centrifugadas a 4000 rpm por 15 minutos e ressuspensas em 500 mililitros de solução de cloreto de magnésio estéril a 10 μ molar para obtenção do tampão de infiltração. Para o ajuste da densidade ótica (OD) a 600 nm (A_{600}) das culturas, as respectivas absorbâncias foram aferidas em um espectrofotômetro (BioPhotometer #6131, Eppendorf) e ajustadas para uma densidade próxima da fase exponencial de crescimento, ou seja, A_{600} entre 0,8 e 1,0 (Lacorte & Ribeiro, 2015).

4.3. Ensaio de agroinfiltração

Para os ensaios de agroinfiltração, folhas de plantas de *N. benthamiana* 45 dias após a germinação e crescidas em casa de vegetação foram imersas em frasco de vidro de 1 litro contendo 500 mililitros do tampão de infiltração contendo as respectivas bactérias. Cada planta tinha em média dez folhas em diferentes estágios de crescimento e todas foram agroinfiltradas.

A planta inteira foi posicionada com a parte aérea dentro de um recipiente plástico de 500 mililitros contendo o tampão de infiltração, com uma esponja isolando a parte radicular, que permaneceu dentro do recipiente com solo em que a planta foi transplantada (Figura 5.). Esta montagem foi alocada dentro da câmara de vácuo (Figura 6.) e submetidos a uma pressão de vácuo de 27 polegadas de Hg por 20 segundos (Figura 7.). Após o procedimento, as plantas com as folhas agroinfiltradas foram mantidas em casa de vegetação por 72 horas.



Figura 5. Montagem do material vegetal para agroinfiltração.

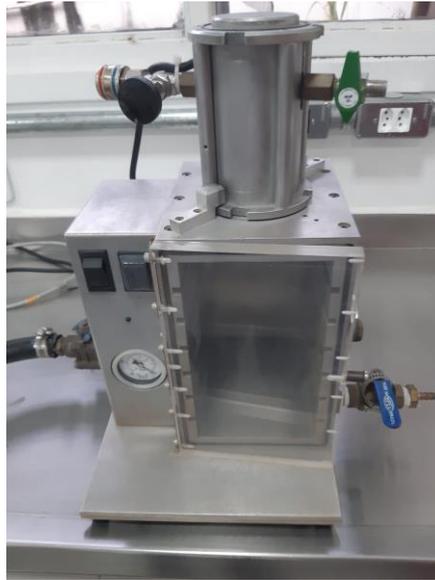


Figura 6. Câmara de vácuo utilizada na agroinfiltração.

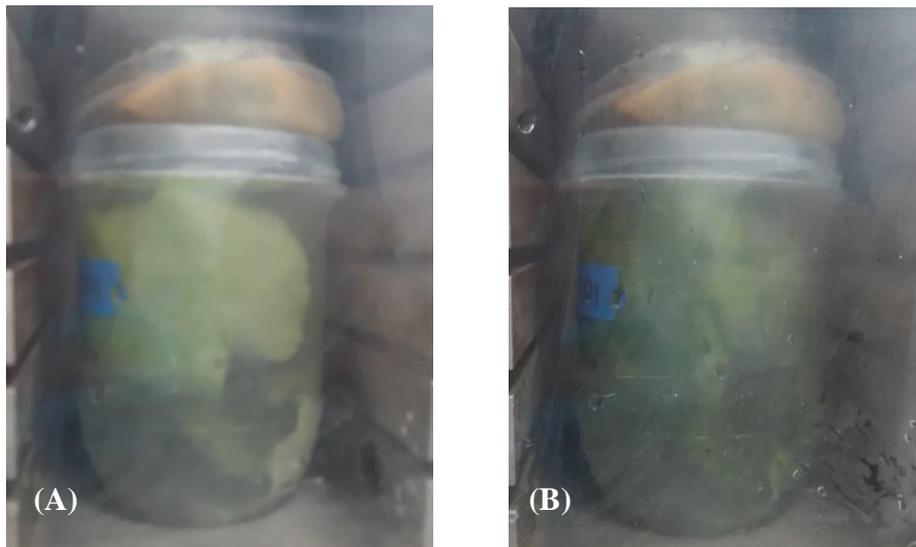


Figura 7. Momento da agroinfiltração, sendo a (A) antes da aplicação do vácuo e (B) depois.

Foram agroinfiltradas cinco plantas por construção. Os controles negativos foram: uma planta WT, cinco plantas agroinfiltradas com a construção *gfp* e uma planta *mock*, a qual foi agroinfiltrada apenas com cloreto de magnésio. O controle positivo para quantificação de resveratrol foram amostras de folhas de amendoim (*Arachis hypogaea*), as quais foram induzidas a produzir resveratrol a partir de luz UV, de um ensaio feito em outro momento.

4.4. Análise da expressão transiente de GFP

Ao final das 72 horas da agroinfiltração, momento em que o pico de expressão da *gfp* é atingido, todas as folhas agroinfiltradas foram cortadas e avaliadas em microscópio de fluorescência com filtro UV (Axiophot, Zeiss) para visualização da expressão de *gfp* (Figura 8.). As três plantas que continham folhas com maior expressão de *gfp* por construção foram selecionadas para coleta dos pools de cada construção de *sts* e a construção controle *gfp*, tendo sido coletadas três folhas por planta. Após a coleta, os pools foram acondicionados em envelopes de papel alumínio e armazenados em freezer a -80 °C.

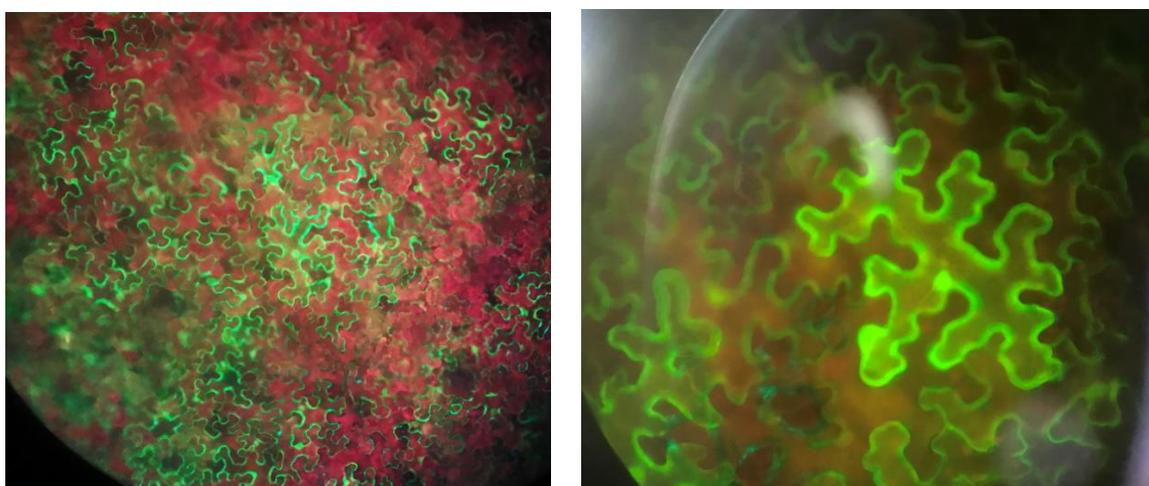


Figura 8. Visualização da expressão de *gfp* em folhas de *N. benthamiana* três dias após a agroinfiltração.

4.5. Liofilização do material

As amostras armazenadas a -80 °C foram retiradas dos envelopes de alumínio e colocadas em tubos Falcon de 50 mL para maceração, em sala escura, com luz indireta. O tubo Falcon foi colocado em nitrogênio líquido com apenas o fundo submerso e as folhas foram maceradas com pistilos de cerâmica, trocados a cada maceração. Em seguida, os tubos de cada um dos pools foram envolvidos em papel alumínio e liofilizados por 96 horas em liofilizador (modelo K120, Liobras). Por fim, as amostras foram pesadas em balança de precisão (modelo M214Ai) e foi estabelecido o conteúdo equivalente a 1 grama de peso fresco, mais próximo possível com a transferência de tubos, em cada tubo Falcon para adequação ao protocolo de quantificação. A fórmula utilizada para tal foi a seguinte:

$$\text{Peso seco equivalente a 1 grama do peso fresco} = \frac{\text{Peso seco}}{\text{Peso fresco}}$$

Por meio do cálculo da média e do desvio padrão, foi verificado se a liofilização de todas as amostras foi bem-sucedida e homogênea. Todos os dados obtidos referentes a liofilização foram analisados a partir da Correlação de Pearson, a fim de estabelecer o quão forte é a correlação entre cada uma das variáveis (peso fresco, peso e perda de água).

4.6. Quantificação de resveratrol

As amostras foram enviadas ao Laboratório de Nanotecnologia para Produção e Sanidade Animal, situado na Embrapa Gado de Leite, para quantificação. Foi utilizada a metodologia analítica quantitativa anteriormente validada para quantificação de trans-resveratrol em folha de tabaco por UPLC-qqq-MS/MS e a metodologia analítica qualitativa nomeada Gradtest17, em que as fases móveis usadas foram água e acetonitrila com fluxo de 0,3 ul/min e a coluna cromatográfica usada foi a Acquity UPLC BEH C18 1,7 um (2,1 x 100 mm) da Waters, equipada com pré-coluna.

Para a análise desses dados foi feito o cálculo da ANOVA, com o objetivo de verificar a variância entre as amostras dentro e fora dos grupos, além de observar se houve diferença significativa entre as variáveis e se os graus de liberdade foram suficientes para garantir a acurácia da análise estatística.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Germinação da planta modelo

A partir das 70 sementes semeadas, cerca de 60 plântulas de *N. benthamiana* germinaram no substrato 3 dias após a semeadura (Figura 9.), obtendo-se uma taxa de germinação de 85,7%. Essas plântulas se desenvolveram adequadamente nas condições semi-controladas de sala de cultura e, após três semanas, quando atingiram aproximadamente 5 centímetros de altura, foram transplantadas para casa de vegetação. Após duas semanas do transplante, as plantas alcançaram o tamanho ideal (aproximadamente 15 centímetros de parte aérea) para acomodação na câmara de vácuo para o ensaio de agroinfiltração (Figura 10.). Para o ensaio, foram selecionadas 30 plantas.



Figura 9. Plântulas de *N. benthamiana* em substrato sete dias após a semeadura.



Figura 10. Plantas de *N. benthamiana* com cerca de 45 dias de idade, no dia do ensaio de agroinfiltração.

5.2 Cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*

A suspensão bacteriana das quatro linhagens de *Agrobacterium tumefaciens* (pPZP-AsSTS2; -AiSTS3; -AcSTS4 e -empty) cresceram após 24 horas de cultivo em LB líquido, obtendo-se uma absorbância a 600 nm (A600) por leitura em espectrofotômetro de 0,15 em média. Após centrifugação, foram obtidos sedimentos bacterianos de cor rosa, o que é típico de *Agrobacterium* spp (Figura 11.). Dessa forma, é possível afirmar que todas as quatro linhagens cresceram adequadamente.



Figura 11. Sedimento bacteriano formado após centrifugação.

5.3 Eficiência de transformação

Após 72 horas do ensaio de agroinfiltração, todas as folhas agroinfiltradas apresentaram expressão do gene *gfp* na visualização em microscópio com filtro de luz UV (Figura 8.), obtendo-se assim a eficiência de transformação de 100%. Essa alta eficiência é esperada em ensaios de agroinfiltração com *N. benthamiana* (Sparkes et al., 2006), visto que a expressão do gene repórter ocorre no citoplasma, sem que seja necessária a inserção do gene no DNA celular.

A transformação estável é caracterizada pela introdução de um gene exógeno na célula, afetando apenas uma fração reduzida das células, cerca de 0,1% (Lacorte & Ribeiro, 2015). Em contraste, a expressão transiente, que ocorre em todas as células infiltradas, oferece diversas

vantagens metodológicas. Esta abordagem não requer a regeneração das células transformadas, preserva a integridade do genoma da planta e é independente dos efeitos associados à posição de integração do T-DNA, além de poder ser monitorada entre 2 e 10 dias após a infiltração (Tyurin et al., 2020). Assim, para determinadas aplicações, como a avaliação preliminar da expressão de genes de interesse, a técnica de agroinfiltração é considerada uma estratégia altamente eficiente.

Ademais, ainda é possível aumentar a eficiência da expressão transiente de transgenes em *N. benthamiana*. A partir de diferentes mecanismos, é possível evitar a resposta imune, a degradação do transcrito, estresse dos retículos endoplasmáticos e proteólise em plantas agroinfiltradas (Beritza et al., 2024). Portanto, essa técnica gera a perspectiva de inúmeras contribuições criativas para que a engenharia genética avance significativamente em um curto intervalo de tempo.

5.4 Liofilização

A liofilização consiste no processo de secagem de material congelado, no qual o conteúdo de água é removido de modo praticamente completo, por meio de sublimação (mudança de estado sólido para gasoso), submetendo-se a amostra a baixas temperaturas e à pressão reduzida simultaneamente (PITOMBO, 2005). Nesse processo, é possível que a porcentagem de perda de água varie entre as amostras liofilizadas, devido a fatores como a temperatura e velocidade do congelamento, além do nível de super-resfriamento, o qual ocorre quando uma amostra é resfriada abaixo do seu ponto de congelamento sem congelar. Esses fatores são fundamentais para o processo de secagem, já que 65% a 90% da umidade inicial está no congelado, de forma que impactam o tempo do processo de liofilização e, conseqüentemente, seu custo (Barazzone, 2022).

Dentre as 14 amostras aqui liofilizadas (Tabela 1.), quatro (GFP Pool 2, GFP Pool 3, STS 2 Pool 2, e STS 3 Pool 1) apresentaram aspecto úmido após a retirada do liofilizador, indicando a não finalização do processo de liofilização, sem que tenha sido observada uma relação com algum fator específico, seja características da amostra ou da execução da liofilização. Essas amostras apresentaram uma média de perda de água, que é a diferença entre o peso úmido antes da liofilização e o peso seco após a liofilização, de 92% que não difere daquela da média das

demais amostra ($93 \pm 3,09\%$). Esses resultados sugerem que a amostra STS 4 Pool 1 foi a única amostra em que não foi possível realizar a aferição do peso seco com precisão, já que alcançou um valor de perda de água superior à média. Ademais, foi obtida a média de perda de água de 93%, dentro do esperado, e desvio padrão de 3,09, o que demonstra homogeneidade entre as amostras, mesmo com a liofilização anormal das amostras citadas anteriormente.

Tabela 1. Peso úmido antes da liofilização e peso seco após a liofilização, e as respectivas porcentagens perdas de água, das 14 amostras de folhas de *N. benthamiana* liofilizadas.

Amostra*	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Perda de água (%)
GFP Pool 1	1,3	0,0970	93
GFP Pool 2**	0,7	0,0690	90
GFP Pool 3**	1,2	0,0963	92
WT Pool 1	1,2	0,0282	98
Mock Pool 1	0,8	0,0246	97
STS 2 Pool 1	2,9	0,01367	95
STS 2 Pool 2**	2,5	0,1476	94
STS 2 Pool 3	1,8	0,1646	91
STS 3 Pool 1**	1,5	0,1192	92
STS 3 Pool 2	1,4	0,1373	90
STS 3 Pool 3	1,9	0,1073	94
STS 4 Pool 1	2,1	0,0021	100
STS 4 Pool 2	1,8	0,0778	96
STS 4 Pool 3	2,3	0,2172	91

GFP representa os pools de plantas infiltradas com o vetor pPZP-empty, STS 2 os pools de plantas infiltradas com o vetor pPZP-AsSTS2, STS 3 os pools de plantas infiltradas com o vetor pPZP-AiSTS3e STS 4 os pools de plantas infiltradas com o vetor; pPZP-AcSTS4. Fonte: Relatório de Envio das Amostras para a Embrapa Gado de Leite (2024).

*Tubo Falcon de 50 mililitros contendo o material vegetal.

**Amostras apresentando aspecto úmido após a liofilização.

A correlação de Pearson entre peso fresco, peso seco e perda de água indica que as variáveis peso fresco/peso seco, e peso fresco/perda de água, são diretamente relacionados, porém a correlação é considerada desprezível, já que é menor que 0,3. Enquanto peso seco/perda de água são inversamente relacionadas, porém igualmente considerada desprezível. Esses dados estão representados na Tabela 2., abaixo:

Tabela 2. Correlação de Pearson entre peso fresco (g), peso seco (g) e perda de água (%).

	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Perda de água (%)
Peso fresco (g)	1		
Peso seco (g)	0,201975	1	
Perda de H₂O (%)	0,143333	-0,0261	1

Fonte: Excel (2024).

5.5 Quantificação de resveratrol

A partir das análises por UPLC-qqq-MS/MS realizadas pela Embrapa Gado de Leite nas folhas de *N. benthamiana* aqui liofilizadas, foram obtidos os resultados da quantificação de resveratrol nestas amostras. (Tabela 3)

Tabela 3. Quantificação do resveratrol por amostra.

Amostra*	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Peso final (g)	Quantificação (ug/g)
GFP Pool 1	1,3	0,0970	0,0746	Não detectado
GFP Pool 2	0,7	0,0690	0,0986	Não detectado
GFP Pool 3	1,2	0,0963	0,0802	Não detectado
WT Pool 1	1,2	0,0282	0,0235	Não detectado
Mock Pool 1	0,8	0,0246	0,0308	Não detectado
CTR (+)	1,0	0,24	-	0,63
STS 2 Pool 1	2,9	0,01367	0,0471	Não detectado
STS 2 Pool 2	2,5	0,1476	0,0590	0,24
STS 2 Pool 3	1,8	0,1646	0,0914	0,27
STS 3 Pool 1	1,5	0,1192	0,0795	0,25
STS 3 Pool 2	1,4	0,1373	0,0981	Não detectado
STS 3 Pool 3	1,9	0,1073	0,0565	Não detectado
STS 4 Pool 1	2,1	0,0021	0,0010	Não detectado
STS 4 Pool 2	1,8	0,0778	0,0432	Não detectado
STS 4 Pool 3	2,3	0,2172	0,0944	Não detectado

GFP representa os pools de plantas infiltradas com o vetor contendo o gene *gfp* pPZP-empty, STS 2 os pools de plantas infiltradas com o vetor pPZP-AsSTS2contendo o gene *Assts2*, STS 3 os pools de plantas infiltradas com o vetor pPZP-AiSTS3contendo o gene *Aists3* e STS 4 os pools de plantas infiltradas com o vetor; pPZP-AcSTS4 contendo o gene *Acsts4*. Peso final = Conteúdo equivalente a 1 grama de peso fresco. Fonte: Relatório do Laboratório de Nanotecnologia para Produção e Sanidade Animal (2024).

*Tubo Falcon de 50 mililitros contendo o material vegetal.

Das 15 amostras, além do controle positivo, somente três (STS 2 Pool 2; STS 2 Pool 3 e STS 3 Pool 1) tiveram seu conteúdo de resveratrol quantificável, isto é, dentro do limite de 0,5 ug/g, o qual é o valor máximo estabelecido pelo método utilizado no Laboratório de

Nanotecnologia para Produção e Sanidade Animal. Este resultado sugere que houve algum problema com a extração de resveratrol das amostras de folhas agroinfiltradas, já que era esperada homogeneidade entre as repetições biológicas (*pools*). O resveratrol é uma molécula bastante instável, sendo facilmente degradada, desse modo, há a necessidade de ajuste do protocolo do preparo das amostras para garantir a devida quantificação nesta etapa. Ao mesmo tempo, os controles negativos (GFP, WT e mock) não apresentaram quantidades de resveratrol detectáveis, enquanto o controle positivo (CTR (+)) apresentou conteúdo quantificável. Este é um resultado esperado visto que *N. benthamiana* não é uma planta que naturalmente produz resveratrol, enquanto o amendoim possui o gene *sts*, logo produz resveratrol quando induzido a condições de estresse, como por exemplo luz UV. Assim, é possível afirmar que a metodologia estabelecida, embora necessitando de ajustes, permite a quantificação de resveratrol.

A análise estatística desses dados foi feita a partir de uma tabela ANOVA (Tabela 4.), sendo os grupos peso fresco, peso seco, peso final e quantificação. A partir desta, foi possível notar que ambos SQ (soma de quadrados) e MQ (quadrado médio) sugerem baixa variação dos dados dentro dos grupos, e maior variação entre grupos. Não existe um F bem superior ao F crítico, o que significa heterogeneidade entre as variâncias das variáveis. E o P-valor bem abaixo de 0,05 significa que existe diferença significativa entre as variáveis. Todavia, os graus de para cada um dos tratamento (não foi possível calcular por esse motivo) e para liberdade entre os grupos é inferior ao desejado, logo, a análise estatística não garante a acurácia desejada.

Tabela 4. ANOVA quantificação do resveratrol por amostra.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	P-valor	F crítico
Entre grupos	26,93981	3	8,979936	85,47457	$4,23 \times 10^{-20}$	2,7826
Dentro dos grupos	5,463106	52	0,10506			
Total	32,4029	55				

Fonte: Excel (2024).

6 CONCLUSÕES

A expressão transiente do gene *gfp*, três dias após a agroinfiltração, se mostrou um eficiente indicador da expressão temporária dos três genes STS que estavam no mesmo vetor binário pPZP, o que permite a validação da metodologia em nosso laboratório como ferramenta útil para caracterização de genes de interesse, de modo rápido e com baixo custo.

É possível quantificar o conteúdo de resveratrol em folhas de *N. benthamiana* agroinfiltradas, entretanto é necessária adequação do protocolo de extração de resveratrol para garantir a estabilidade do metabólito nestas amostras.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O resveratrol é um metabólito mundialmente reconhecido por suas diversas propriedades farmacológicas. Com isso, a sua produção em larga escala possui o potencial de ser facilmente absorvido pelo mercado consumidor, podendo alcançar inclusive nível industrial. Portanto, a produção de resveratrol se mostra uma oportunidade de negócio interessante.

Nesse cenário, o estabelecimento de uma metodologia simples, sem necessidade de um grande investimento em infraestrutura, a partir de genes isolados de espécies nativas brasileiras é um avanço na pesquisa da engenharia genética, a qual pode gerar um grande impacto a curto prazo. Esta pode ser considerada uma forma de valorização da biodiversidade nacional, juntamente com a criação de novas oportunidades de aplicação da biotecnologia na produção do país, contribuindo com a economia.

A utilização de plantas de tabaco como biofábricas de resveratrol a partir da expressão transiente de genes de *Arachis* é uma inovação do grupo de pesquisa do laboratório LPPIII, da Embrapa CENARGEN, que pretende contribuir para que de fato sejam implementados modelos de negócio economicamente viáveis.

8 REFERÊNCIAS

- Beritza, K., Watts, E. C., & van der Hoorn, R. A. L. (2024). Improving transient protein expression in agroinfiltrated *Nicotiana benthamiana*. *New Phytologist*, *243*(3), 846–850. <https://doi.org/10.1111/nph.19894>
- Bostanghadiri, N., Pormohammad, A., Chirani, A. S., Pouriran, R., Erfanimanesh, S., & Hashemi, A. (2017). Comprehensive review on the antimicrobial potency of the plant polyphenol Resveratrol. Em *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 95, p. 1588–1595). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.084>
- Brasileiro ACM, Carneiro VTC. (2015). Manual de transformação genética de plantas (2a Edição). Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, Brasília, Brasil.
- Brasileiro, A. C. M., Gimenes, M. A., Pereira, B. M., Mota, A. P. Z., Aguiar, M. N., Martins, A. C. Q., Passos, M. A. S., & Guimaraes, P. M. (2023). The Stilbene Synthase Family in *Arachis*: A Genome-Wide Study and Functional Characterization in Response to Stress. *Genes*, *14*(12). <https://doi.org/10.3390/genes14122181>
- Carvalho et al. 2020. *Presence of resveratrol in wild Arachis species adds new value to this overlooked genetic resource (1)*. ([s.d.]).
- Carvalho, P. A. S. de V., de Carvalho Moretzsohn, M., Brasileiro, A. C. M., Guimarães, P. M., da Silveira Agostini-Costa, T., da Silva, J. P., & Gimenes, M. A. (2020). Presence of resveratrol in wild *Arachis* species adds new value to this overlooked genetic resource. *Scientific Reports*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68648-1>
- Celso, A., & Valois, C. (2001). *IMPORTÂNCIA DOS TRANSGÊNICOS PARA A AGRICULTURA* (Número 1).
- Chialva, C., Muñoz, C., Miccono, M., Eichler, E., Calderón, L., Prieto, H., & Lijavetzky, D. (2018). Differential Expression Patterns Within the Grapevine Stilbene Synthase Gene Family Revealed Through Their Regulatory Regions. *Plant Molecular Biology Reporter*, *36*(2), 225–238. <https://doi.org/10.1007/s11105-018-1073-3>
- Dias, G., Silva, M., & Carneiro, P. (2017). A engenharia genética de precisão: status atual e perspectivas regulatórias para as novas ferramentas de melhoramento genético. Uberlândia, Céleres.

- Fernández Ríos D, Benítez Candia N, Soerensen MC, Goberna MF, Arrúa AA. Regulatory landscape for new breeding techniques (NBTs): insights from Paraguay. *Front Bioeng Biotechnol.* 2024 Jan 24;12:1332851. doi: 10.3389/fbioe.2024.1332851. PMID: 38328441; PMCID: PMC10847525.
- Filardo, S., Di Pietro, M., Mastromarino, P., & Sessa, R. (2020). Therapeutic potential of resveratrol against emerging respiratory viral infections. Em *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 214). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107613>
- Fischer, R., Vaquero-Martin, C., Sack, M., Drossard, J., Emans, N., & Commandeur, U. (1999). Towards molecular farming in the future: transient protein expression in plants. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 30(2), 113–116. <https://doi.org/10.1111/j.1470-8744.1999.tb00900.x>
- Giovana Cappio Barazzone São Paulo, D. (2022). *Escola Superior de Ensino do Instituto Butantan Programa de Pós-graduação Lato Sensu Mestrado em Biotecnologia e Bioprocessos LORENA RODRIGUES GUIMARÃES SILVA NOTA TÉCNICA: Liofilização e Operacionalização do Equipamento.*
- Guimarães, P. M., Brasileiro, A. C. M., Morgante, C. V., Martins, A. C. Q., Pappas, G., Silva, O. B., Togawa, R., Leal-Bertioli, S. C. M., Araujo, A. C. G., Moretzsohn, M. C., & Bertioli, D. J. (2012). Global transcriptome analysis of two wild relatives of peanut under drought and fungi infection. *BMC Genomics*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-387>
- Jeong, Y. J., An, C. H., Woo, S. G., Park, J. H., Lee, K. W., Lee, S. H., Rim, Y., Jeong, H. J., Ryu, Y. B., & Kim, C. Y. (2016). Enhanced production of resveratrol derivatives in tobacco plants by improving the metabolic flux of intermediates in the phenylpropanoid pathway. *Plant Molecular Biology*, 92(1–2), 117–129. <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0497-0>
- Lacorte, C., Ribeiro, S. (2015). Capítulo 7: Expressão transiente e indução de silenciamento utilizando *Agrobacterium* spp. e vetores virais. Manual de transformação genética de plantas (2a Edição). Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, Brasília, Brasil.
- Lygin, A. V., Hill, C. B., Pawlowski, M., Zernova, O. V., Widholm, J. M., Hartman, G. L., & Lozovaya, V. V. (2014). Inhibitory effects of stilbenes on the growth of three soybean pathogens in culture. *Phytopathology*, 104(8), 843–850. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-13-0287-R>

- Naves, A. G. de L., Menechini, W., Ortiz, T. A., Souza, S. G. H. de, & Silva, E. C. da. (2024). Desafios e oportunidades na incorporação de tecnologias biotecnológicas na agricultura. *DELOS: Desarrollo Local Sostenible*, 17(55), e1444. <https://doi.org/10.55905/rdelosv17.n55-013>
- Margolin, E., Chapman, R., Williamson, A. L., Rybicki, E. P., and Meyers, A. E. (2018). Production of complex viral glycoproteins in plants as vaccine immunogens. *Plant Biotechnol. J.* 19, 1531–1545. doi: 10.1111/pbi.12963
- Patel, J., & Mishra, A. (2019). Genome editing: Advances and prospects. *Plant biotechnology: progress in genomic era*, 147-174.
- Plants for the future. Multilateral Meeting on 'The Future of Plant Breeding Techniques in the European Union' | Meeting Report. (2014). Ref. Ares(2014)4258256 - 17/12/2014
- Pitombo, R.N.M. Liofilização. In: PESSOA JR, A.; KILIKIAN, B. V. Purificação de Produtos Biotecnológicos. Barueri, SP: Manole, p. 332-347, 2005.
- Pogue, G. P., Vojdani, F., Palmer, K. E., Hiatt, E., Hume, S., Phelps, J., Long, L., Bohorova, N., Kim, D., Pauly, M., Velasco, J., Whaley, K., Zeitlin, L., Garger, S. J., White, E., Bai, Y., Haydon, H., & Bratcher, B. (2010). Production of pharmaceutical-grade recombinant aprotinin and a monoclonal antibody product using plant-based transient expression systems. Em *Plant Biotechnology Journal* (Vol. 8, Número 5, p. 638–654). <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00495>.
- Ricroch, A. E., Martin-Laffon, J., Rault, B., Pallares, V. C., & Kuntz, M. (2022). Next biotechnological plants for addressing global challenges: The contribution of transgenesis and new breeding techniques. *New biotechnology*, 66, 25-35.
- Rosado, A., & Eriksson, D. (2022). Biosafety legislation and the regulatory status of the products of precision breeding in the Latin America and the Caribbean region. Em *Plants People Planet* (Vol. 4, Número 3, p. 214–231). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10243>
- Silva, L. R. G. (2022). Liofilização e operacionalização do equipamento.
- Sparkes, I. A., Runions, J., Kearns, A., & Hawes, C. (2006). Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nature Protocols*, 1(4), 2019–2025. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.286>
- Streatfield, S. J. (2007). Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants. Em *Plant Biotechnology Journal* (Vol. 5, Número 1, p. 2–15). <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2006.00216.x>

Vinson, C. C., Mota, A. P. Z., Oliveira, T. N., Guimaraes, L. A., Leal-Bertioli, S. C. M., Williams, T. C. R., Nepomuceno, A. L., Saraiva, M. A. P., Araujo, A. C. G., Guimaraes, P. M., & Brasileiro, A. C. M. (2018). Early responses to dehydration in contrasting wild *Arachis* species. *PLoS ONE*, *13*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198191>