

PRISCILLA FALQUETTO GOMES

**INTRODUÇÃO DE CARACTERÍSTICAS DO MECANISMO FOTOSSINTÉTICO C₄
EM ESPÉCIES C₃ DA FAMÍLIA CLEOMACEAE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Adriano Nunes Nesi

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

G633i
2021
Gomes, Priscilla Falchetto, 1993-
Introdução de características do mecanismo fotossintético
C4 em espécies C3 da família Cleomaceae / Priscilla Falchetto
Gomes. – Viçosa, MG, 2021.

1 dissertação eletrônica (48 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Adriano Nunes Nesi.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2021.083>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Cleomaceae. 2. Hibridação vegetal. 3. Fotossíntese.
4. Cleomaceae - Metabolismo. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de
Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 583.64

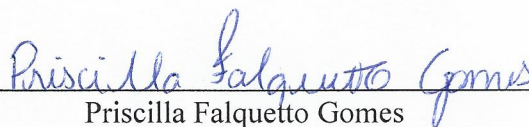
PRISCILLA FALQUETTO GOMES

INTRODUÇÃO DE CARACTERÍSTICAS DO MECANISMO FOTOSSINTÉTICO C₄
EM ESPÉCIES C₃ DA FAMÍLIA CLEOMACEAE

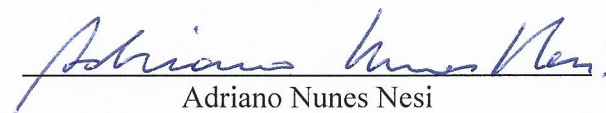
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 16 de julho de 2021

Assentimento:


Priscilla Falquetto Gomes

Autora


Adriano Nunes Nesi

Orientador

*Aos meus pais Eduardo e Giovana e ao meu irmão Filipe,
por todo amor, carinho, ensinamento e exemplo.*

Com carinho, Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me guiar proporcionando oportunidades e sabedoria.

Aos meus pais, Eduardo e Giovana, e ao meu irmão Filipe, pela base, pela cumplicidade e apoio em toda minha trajetória.

À toda minha família e amigos, por me encorajar a acreditar no meu sucesso, sem eles a caminhada seria dura e desprazerosa.

Ao meu orientador prof. Dr. Adriano Nunes Nesi, pela oportunidade, pelos ensinamentos, disposição e comprometimento em me orientar em benefício do meu crescimento profissional.

Aos meus demais mestres, por todo o ensinamento compartilhado, sem eles todo o conhecimento não poderia ser praticado.

À Daniele Parma por toda ajuda no planejamento dos experimentos, as ideias e esforços investidos nesse trabalho.

Aos meus colegas de laboratório Luciana Zacour, Júnio Souza, Sandy Martins e Kaik Faria por toda ajuda com a realização e condução do experimento, vocês foram essenciais para a finalização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de estudos. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento do projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Por fim, a todos que de maneira direta ou indiretamente participaram e contribuíram para que fosse possível a conclusão de mais esta etapa, sou infinitamente grata.

RESUMO

GOMES, Priscilla Falchetto, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2021. **Introdução de características do mecanismo fotossintético C₄ em espécies C₃ da família Cleomaceae.** Orientador: Adriano Nunes Nesi.

Cleomaceae é uma família de plantas interessante para estudos de evolução do mecanismo fotossintético C₄, uma vez que contém representantes dos três mecanismos (C₃, C₄ e C₃-C₄). O mecanismo fotossintético C₄ evoluiu independentemente da fotossíntese C₃. Para estabelecimento do mecanismo C₄ ocorreram adaptações morfofisiológicas nas plantas, tais como a diferenciação de células da bainha do feixe vascular, alterações da maquinaria enzimática e aumento do transporte de metabólitos, gerando um mecanismo com maior eficiência fotossintética. Neste trabalho foram gerados híbridos interespecíficos entre duas espécies C₃ (*T. hassleriana* e *T. longicarpa*) e uma espécie C₄ (*G. gynandra*), ambas da família Cleomaceae., a fim de promover interações genômicas que resultam em fenótipos distintos dos observados nos parentais em relação ao mecanismo fotossintético. Os híbridos e parentais foram avaliados em termos de características anatômicas, bioquímicas e fisiológicas. As linhas híbridas obtidas entre o cruzamento de *T. longicarpa* e *G. gynandra* apresentaram anatomia proto-Kranz, caracterizadas por aumento na largura das células da bainha do feixe vascular, aumento na densidade de venação, e redução na distância internerval, além de apresentarem redução de aproximadamente 20% no ponto de compensação de CO₂ em relação a *T. longicarpa*. O perfil metabólico em folhas dessas mesmas linhas híbridas apresentou mínimas diferenças, porém capazes de diferenciar híbridos e parentais em uma análise de componentes principais. Em termos de viabilidade de sementes verificou-se que os cruzamentos entre *T. longicarpa* e *G. gynandra* produziram sementes viáveis e descendentes férteis, apresentando potencial para seguir com estudos na população F₂. Portanto, os resultados obtidos demonstram o potencial da hibridação interespecífica utilizando espécies da família Cleomaceae em oferecer novas perspectivas para estudos de mecanismos concentradores de CO₂ em plantas.

Palavras-chave: Cleomaceae. Hibridação interespecífica. Mecanismos concentradores de CO₂. Metabolismo.

ABSTRACT

GOMES, Priscilla Falchetto, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2021. **Introducing C₄ photosynthetic mechanism related traits into C₃ species of the Cleomaceae family.**
Advisor: Adriano Nunes Nesi.

Cleomaceae family contains representatives of three photosynthetic mechanisms (C₃, C₄ and C₃-C₄). Thus, this is an interesting family of plants for studies on evolution of C₄ photosynthetic mechanism. The C₄ photosynthetic mechanism evolved independently from C₃ photosynthesis. For establishment of C₄ mechanism, morphophysiological adaptations have occurred in plants, such as differentiation of bundle sheath cells, alterations of enzymatic machinery and increase of metabolic transport, generating a mechanism with greater photosynthetic efficiency. In this work, we generated interspecific hybrids of the C₃ species *Tarenaya hassleriana* and *Tarenaya longicarpa* and the species C₄ *Gynandropsis gynandra*, all from Cleomaceae family, in order to promote genomic interactions that result in distinct phenotypes from the ones observed in parents. The hybrids and the parents were evaluated in terms of anatomic, biochemical and physiological traits. The obtained hybrid lines exhibited proto-Kranz like anatomy, characterized by increased number of bundle sheath cells, higher venation density, and reduction in internodal distance. The hybrid genotypes exhibited about 20% lower CO₂ compensation point in relation to the C₃ parental *T. longicarpa*. Illuminated leaf metabolite profile of hybrid genotypes showed mild alterations, but yet capable of differentiating hybrids and parents in a principal component analysis. In terms of seed viability, it was found that crosses between *T. longicarpa* and *G. gynandra* produced viable seeds and fertile descendants, with potential to continue with studies in the F₂ population. Therefore, the obtained results demonstrate the potential of interspecific hybridization using species from Cleomaceae family to offer new perspectives for studies of CO₂ concentrator mechanisms in plants.

Keywords: Cleomaceae. Interspecific hybridization. CO₂ concentrating mechanisms. Metabolism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Combinações de hibridação interespecífica entre espécies C ₃ (<i>T. hassleriana</i> e <i>T. longicarpa</i>) e C ₄ (<i>G. gynandra</i>)	25
Figura 2 -	Variações fenotípicas em folhas de diferentes espécies de Cleomaceae e suas linhas híbridas interespecíficas resultantes	26
Figura 3 -	Variação natural dos traços anatômicos e parâmetros de trocas gasosas nas folhas em espécies de Cleomaceae e híbridos interespecíficos.....	27
Figura 4 -	Folhas completamente expandidas, folhas de secção transversal e densidade de venação em folhas da espécie Cleomaceae e híbridos interespecíficos.....	28
Figura 5 -	Variação natural dos traços anatômicos e dos parâmetros de trocas gasosas em folhas de espécies de Cleomaceae e híbridos interespecíficos.....	30
Figura 6 -	Parâmetros de trocas gasosas e fluorescência em espécies de Cleomaceae e híbridos interespecíficos.....	31
Figura 7 -	Níveis de metabólitos extraídos de folhas em espécies de Cleomaceae e híbridos interespecíficos.....	33
Figura 8 -	Mapa de calor que representa as alterações no conteúdo relativo de metabólitos nas folhas ao meio do dia e análise de componentes principais (PCA) representando as alterações no teor relativo de metabólitos ao meio dia, via análise por GC-MS.....	35
Figura 9 -	Níveis de metabólitos extraídos de folhas e composição isotópica do carbono em espécies de Cleomaceae e híbridos interespecíficos.....	36
Figura 10 -	Avaliação dos parâmetros de germinação população F2 de espécies de Cleomaceae e híbridos interespecíficos.....	37

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2 PG	ácido 2-fosfoglicolato
3 PGA	ácido 3-fosfoglicerato
A	Fotossíntese
AFE	Área foliar específica
BS	Células da bainha do feixe vascular foliar
Ci	Concentrações internas de CO ₂
gs	Condutância estomática
E	Transpiração
G	Germinação
GC-MS	Cromatografia gasosa-espectrometria de massa
<i>G. gynandra</i>	<i>Gynandropsis Gynandra</i>
GgxTh	Híbrido <i>Gynandropsis gynandra</i> x <i>Tarenaya hassleriana</i>
GgxTl	Híbrido <i>Gynandropsis gynandra</i> x <i>Tarenaya longicarpa</i>
IRGA	Infrared Gas Analyzer
IVG	Índice de velocidade de germinação
M	Células do mesófilo
PEPcase	fosfoenolpiruvato carboxilase
PPFD	Densidade do fluxo de fótons fotossintético
R _d	Respiração noturna
RuBP	ribulose 1,5-bisfosfato
RuBisCO	ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase
<i>T. hassleriana</i>	<i>Tarenaya hassleriana</i>
<i>T. longicarpa</i>	<i>Tarenaya longicarpa</i>
ThxGg	Híbrido <i>Tarenaya hassleriana</i> x <i>Gynandropsis gynandra</i>
TlxGg	Híbrido <i>Tarenaya longicarpa</i> x <i>Gynandropsis gynandra</i>
VMG	Velocidade média de germinação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1. MATERIAL E MÉTODOS	17
2.1. Condições de cultivo	17
2.2. Hibridação interespecífica	18
2.3. Manutenção dos híbridos interespecíficos	18
2.4. Anatomia foliar	18
2.5. Parâmetros de trocas gasosas e fluorescência	19
2.6. Seleção de linhas híbridas promissoras	20
2.7. Análises bioquímicas	20
2.8. Análises de perfil metabólico	21
2.9. Composição isotópica do carbono	21
2.10. Auto cruzamento dos híbridos e análise da geração F2	22
2.11. Análises estatísticas	23
3. RESULTADOS	24
3.1. Hibridações interespecíficas entre espécies de Cleomaceae	24
3.2. Caracterização fenotípica das linhagens híbridas	26
3.3. Avaliação dos parâmetros anatômicos e de trocas gasosas	29
3.4. Avaliação de parâmetros bioquímicos	32
3.6. Composição isotópica do carbono	35
3.7. Geração e análise da população F2	37
4. DISCUSSÃO	38
4.1. Viabilidade de produção de híbridos interespecíficos em Cleomaceae	38
4.2. Híbridos interespecíficos de <i>T. longicarpa</i> e <i>G. gynandra</i> apresentam características de anatomia proto-Kranz	38
4.3. Alterações no ponto de compensação de CO₂ em híbridos interespecíficos de <i>T. longicarpa</i> e <i>G. gynandra</i>	39

4.4. Híbridos interespecíficos de <i>T. longicarpa</i> e <i>G. gynandra</i> apresentam parâmetros fisiológicos e metabólicos semelhantes ao de espécies C₃.....	40
5. CONCLUSÕES	42
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1. INTRODUÇÃO

A fotossíntese é um dos processos mais importantes para a existência de vida na terra. As moléculas orgânicas formadas pela fotossíntese fornecem não apenas a energia, mas também intermediários que compõem os organismos vivos. No processo da fotossíntese CO_2 é reduzido a trioses-fosfatadas pelo Ciclo de Calvin-Benson. Inicialmente o CO_2 é ligado à ribulose 1,5-bisfosfato (RuBP) pela enzima ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO), produzindo um intermediário de seis carbonos instável que é hidrolisado para produzir duas moléculas de ácido 3-fosfoglicerato (3PGA) (Sharkey, 2019). Além da atividade carboxilásica, a RuBisCO também é capaz de realizar atividade oxigenásica, levando à produção de uma molécula de 3PGA e uma molécula de ácido 2-fosfoglicolato (2PG) (Von Caemmerer, 2012; Shi e Bloom, 2021).

O 2PG é um metabólito capaz de inibir a atividade de enzimas do próprio Ciclo de Calvin-Benson, o que o torna tóxico por inibir a fotossíntese em plantas C_3 em ambiente com baixo CO_2 atmosférico (Ferne e Bauwe, 2020). Assim, para que a fotossíntese ocorra em ambientes com baixa concentração de CO_2 , o 2PG deve ser convertido em 3PGA por uma série de reações enzimáticas e etapas de transporte em um processo metabólico chamado fotorrespiração (Ferne e Bauwe, 2020; Shi e Bloom, 2021). Fotorrespiração requer gasto energético e, quando ocorre, implica em menor fixação líquida de CO_2 pelas plantas e menor produção (Weber e Bar-Even, 2019; Shi e Bloom, 2021). A fotorrespiração é um dos processos metabólicos que contribuem para a ineficiência da conversão da energia fotossintética, pois recupera apenas 75% do carbono contido no 2PG (Weber e Bar-Even, 2019; Shi e Bloom, 2021). Sendo assim, elevadas taxas de fotorrespiração reduzem consideravelmente a síntese de carboidratos e a produtividade das plantas em altas temperaturas e outras condições ambientais que reduzam a concentração de CO_2 no estroma do cloroplasto (Smith *et al.*, 1976; Weber e Bar-Even, 2019). Como descrito acima, apesar de reduzir a eficiência fotossintética, a fotorrespiração é considerada essencial para as plantas C_3 uma vez que, além de converter 2PG em 3PGA, está associada a redução na fotoinibição através da dissipação do excesso de energia, bem como envolvida no metabolismo do nitrogênio, especificamente na síntese glicina e serina e assimilação do NH_4^+ (Shi e Bloom, 2021). Fatores como aumento da temperatura e concentração dos gases na atmosfera fazem com que a especificidade da RuBisCO pelo CO_2 seja reduzida, favorecendo a sua atividade oxigenásica e, conseqüentemente, acarretando em maiores taxas de fotorrespiração (Jordan e Ogren, 1984; Brooks e Farquhar, 1985; Bathellier *et al.*, 2018). Nesse sentido, as plantas apresentam várias estratégias, tanto anatômicas quanto metabólicas, para reduzir a fotorrespiração e compensar seus efeitos inibitórios. Entre as

estratégias, estão os mecanismos concentradores de carbono das plantas C₄ (Sage, 2004, 2021; Moore *et al.*, 2021; Shi e Bloom, 2021).

As plantas C₄ surgiram durante um período onde houve uma redução gradativa na concentração de CO₂ atmosférico favorecendo a atividade oxigenásica da Rubisco (Sage *et al.*, 2004). Para contornar tal problema, ao longo do processo de evolução das plantas surgiram os mecanismos concentradores de CO₂ (Iñiguez C. *et al.*, 2019). Plantas C₄ apresentam um mecanismo que concentra CO₂ em torno da RuBisCO, reduzindo sua atividade oxigenásica. Essas plantas apresentam uma anatomia diferenciada chamada “Anatomia Kranz”, caracterizada por um conjunto de características anatômicas, estruturais e bioquímicas que culminam na realização da fotossíntese C₄ (Furbank *et al.*, 2011, 2021; Ermakova *et al.*, 2021). Essa anatomia estrutural diferencial juntamente com modificações bioquímicas faz com que haja uma separação espacial com sistema duplo de carboxilação, favorecendo a atividade carboxilásica da enzima RuBisCO (Hatch, 1988; Furbank *et al.*, 2011, 2021; Sage 2004, 2021). As principais características anatômicas presentes na anatomia Kranz são células da bainha do feixe vascular com maior diâmetro e largura, maior densidade de venação, menor distancia internerval, maior densidade mitocondrial e organelas organizadas centripetamente em relação ao feixe vascular (Sage, 2021). Resumidamente, nesse mecanismo o CO₂ atmosférico é convertido em sua forma iônica HCO₃⁻ nas células mesofílicas pela anidrase carbônica, e fixado pela enzima citosólica fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPcase). Após a fixação inicial do HCO₃⁻ pela PEPcase, ocorre a formação de ácido oxaloacético que, em seguida, atuam como fontes de CO₂ por meio de descarboxilases que podem ser Fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPC), enzima málica dependente de NAD (isoforma mitocondrial, NAD-ME) ou enzima málica dependente de NADP (isoforma cloroplastídica, NADP-ME), nas células da bainha do feixe vascular, onde CO₂ é liberado próximo a RuBisCO, favorecendo sua atividade carboxilásica (Hatch, 1988; Sage 2004, 2021; Ermakova *et al.* 2021).

Como consequência, ao concentrar mais CO₂ em torno da RuBisCO inibindo sua atividade oxigenásica, mecanismos concentradores de CO₂ inibem a produção de 2PG e consequentemente a fotorrespiração. Espécies de plantas com mecanismo C₄ apresentam um menor ponto de compensação de CO₂, maior fotossíntese líquida, alta eficiência no uso da água e alta tolerância a limitações do solo (Oakley *et al.*, 2014). Esse conjunto de características conferem a essas plantas uma maior eficiência fotossintética e assim maior rendimento em comparação as plantas C₃ principalmente em ambientes quentes e secos. (Covshoff e Hibberd, 2012; Oakley *et al.*, 2014).

As espécies de plantas C_4 surgiram cerca de 30 milhões de anos atrás, durante o Oligoceno (Sage, 2004). Durante esse período geológico houve, primeiro uma diminuição na disponibilidade de água e, em seguida, uma diminuição gradativa na concentração de CO_2 atmosférico e aumento na temperatura (Sage et. al., 2004; Zhou, Helliker, Huber, Dicks, e Akçay, 2018) Com a maior concentração de oxigênio na atmosfera, a enzima RuBisCO passou a ter maior atividade oxigenásica, aumentando consideravelmente as taxas de fotorrespiração. Além disso, as altas temperaturas levam a maiores perdas de água pelas plantas, fazendo com que estas mantivessem seus estômatos menos abertos, diminuindo as taxas fotossintéticas. Como uma soma de consequências as plantas tiveram uma redução significativa na sua eficiência fotossintética e precisaram desenvolver uma estratégia de sobrevivência, desenvolvendo assim os mecanismos concentradores de CO_2 (Zhou, Helliker, Huber, Dicks, e Akçay, 2018). Apesar de sua complexidade, o mecanismo C_4 evoluiu independentemente mais de 60 vezes (Sage, 2021). Sendo que a transição do mecanismo C_3 para C_4 ocorreu em uma série de eventos transitórios, o que gerou uma diversidade bioquímica e estrutural nas formas de plantas C_4 . Abrindo caminho para diversos estudos filogenéticos distintos sobre a origem desse mecanismo, que levaram a elaboração de modelos preditivos sobre a evolução do mecanismo C_4 . A maioria dos modelos preditivos propõem que a evolução do mecanismo C_4 se inicia com mudanças anatômicas e estruturais e citam a atividade da enzima glicina descarboxilase restrita as mitocôndrias das células da bainha do feixe vascular como mudança intermediária essencial para estabelecimento do ciclo C_4 (Koteyeva, Voznesenskaya, Roalson, e Edwards, 2011; Sage, 2021).

Além dos mecanismos fotossintéticos C_3 e C_4 existem ainda espécies que se classificam como intermediários C_3 - C_4 (Sage, 2021). Estas não consistem em um fenótipo distinto e estritamente intermediário, mas sim abrangem uma ampla gama de fenótipos entre o mecanismo fotossintético C_3 e C_4 em relação á características anatômicas, bioquímicas e fisiológicas (Sage, 2021). As plantas intermediárias C_3 - C_4 apresentam, de modo geral, como características principais: (i) redução do ponto de compensação de CO_2 ; (ii) sensibilidade reduzida da RuBisCO pelo O_2 ; e (iii) células da bainha do feixe vascular com um maior número de cloroplastos e mitocôndrias organizados centripetamente, em comparação às espécies C_3 (Sage, 2021). Podendo estes fenótipos intermediários estarem mais próximos de C_3 ou mais perto de C_4 , que caracteriza melhor alguns deles como o Proto-Kranz, onde ocorrem apenas algumas alterações anatômicas e arranjo de organelas tornando as células da bainha do feixe vascular fotossinteticamente ativas (Sage, 2021). O mecanismo C_2 tipo I e II, que possui como

característica diferencial a atividade da glicina descarboxilase restritas as mitocôndrias das células da bainha do feixe vascular. Já o mecanismo tipo pré-C₄, que apresenta características bioquímicas do mecanismo C₄, é considerado a fase final de estabelecimento do mecanismo C₄ em si (Sage, 2019, 2021). Estudos filogenéticos sugerem que as espécies que apresentam o metabolismo intermediário C₃-C₄ representam etapas transitórias no processo evolutivo do mecanismo fotossintético (Lyu *et al.*, 2015).

Estudos recentes sugerem que a família Cleomaceae, a qual possui espécies C₃, intermediárias C₃-C₄ e C₄ representa um modelo de estudos de mecanismos concentradores de CO₂ (Bayat *et al.*, 2018). Considerando as características de tal família botânica, Cleomaceae é considerado um grupo promissor para estudos acerca da origem do mecanismo fotossintético C₄ e suas características intrínsecas, além de servir como modelo para estudos fisiológicos e metabólicos (Brown *et al.*, 2005; Newell *et al.*, 2010; Bayat *et al.*, 2018). Tal família possui proximidade filogenética com a família Brassicaceae, a qual pertencem várias espécies C₃ de importância comercial como brócolis, repolho, canola (Bayat *et al.*, 2018). Dessa forma, os resultados obtidos em trabalhos de filogenia molecular utilizadas em conjunto com as já obtidas para *Arabidopsis thaliana* (modelo de plantas C₃) podem auxiliar diversos outros estudos, como por exemplo a elucidação do estabelecimento do mecanismo C₄ (Schuler *et al.*, 2016).

A família Cleomaceae compreende 25 gêneros e mais de 200 espécies (Thulin *et al.*, 2017; Roalson *et al.*, 2015; 2017; Barrett *et al.*, 2017; Luciano *et al.*, 2018). No Brasil, ocorrem sete gêneros e 33 espécies, as quais são encontradas em todos os domínios geográficos (Flora do Brasil, 2019). Com base nos resultados obtidos por Patchell *et al.* (2014) sabe-se que em Cleomaceae o mecanismo C₄, que está presente nas espécies *Coalisina angustifolia*, *Gynandropsis gynandra* e *Areocleome oxalidea*. O mecanismo intermediário C₃-C₄ é encontrado na espécie *Coalisina paradoxa*, e o mecanismo C₃ é encontrado nas demais espécies. Uma caracterização completa das espécies de Cleomaceae encontradas no Brasil em termos anatômicos, bioquímicos e fotossintéticos foi recentemente realizada, o que possibilitou a separação das espécies em diferentes grupos filogenéticos (Parma *et al.*, *submetido*).

Até o momento, são poucas as informações precisas acerca do desenvolvimento e instalação do mecanismo C₄. Os estudos nessa área têm focado na predição de modelos evolutivos do mecanismo C₄. Para tal, estes estudos são realizados comumente utilizando espécies com fenótipos intermediários C₃-C₄ (Lyu *et al.*, 2015; Schuler *et al.*, 2016). Os fenótipos intermediários surgiram de forma natural em algumas espécies de como *Coalisina paradoxa*, *Flaveria chloraefolia* e *Flaveria linearis* (Sage, 2021), mas acredita-se que a

ocorrência de fenótipos intermediários também possa ter uma origem híbrida (Kadereit *et al.*, 2017). Assim, outros métodos empregados utilizam a criação de híbridos interespecíficos que apresentem fenótipos intermediários para serem utilizados no estudo do mecanismo C₄ uma vez que, intermediários de origem híbrida são indistinguíveis de espécies intermediárias de ocorrência natural (Brown *et al.*, 1986; Ueno *et al.*, 2003; Kadereit *et al.*, 2017).

O primeiro híbrido interespecífico entre espécies com mecanismo C₃ e C₄ foi produzido utilizando espécies de *Atriplex*, seguido pela criação de híbridos entre espécies do gênero *Flaveria*, *Panicum* e *Moricandia* em meados de 1990. Na época, devido à falta de recursos a maioria dos estudos com híbridos foram abandonados (Oakley *et al.*, 2014). Com o avanço das tecnologias de sequenciamento de genomas e bioinformática, a capacidade de avaliar as diferenças genéticas entre parentais, híbridos e seus descendentes aumentou consideravelmente, possibilitando identificar os genes expressos diferencialmente entre espécies com diferentes mecanismos fotossintéticos, híbridos e parentais, as diferenças nas atividades enzimáticas e metabólicas. Entretanto, ainda não foi encontrado um modelo híbrido eficaz a ponto de responder os questionamentos nas fases do estabelecimento do mecanismo C₄ de forma objetiva (Oakley *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2021; Sage 2021).

Recentemente um trabalho realizado por Ermakova *et al.* (2021), relatou a instalação de enzimas da via fotossintética C₄ em arroz usando uma única construção genética. Através da utilização de cinco transgenes C₄ enzimáticos (anidrase carbônica, PEPC, NADP-malato desidrogenase (NADP-MDH), piruvato ortofosfato dicinase (PPDK) e enzima NADP-málica (NADP-ME) de *Zea mays*). A expressão gênica, o acúmulo de proteínas e a atividade enzimática foram confirmados para todos os cinco transgenes e a localização intercelular de proteínas foi analisada. Ao final, os fenótipos fotossintéticos observados das plantas transgênicas foram consistentes com a carboxilação que ocorre em espécies C₄. Estes resultados sugerem que uma via metabólica C₄ completa pode ser alcançável no arroz. Tal resultado reforça a possibilidade de criar um fenótipo transgênico C₄, através de um conjunto de genes mínimos capazes de induzir o estabelecimento de um mecanismo fotossintético C₄ em plantas C₃.

Além do mais, características bioquímicas e enzimas essenciais ao metabolismo C₄ como anidrase carbônica, PEPCase e glicina descarboxilase estão presentes no modelo C₃, o que sugere que existam modelos regulatórios pré existentes em plantas C₃ capazes de expressar genes essenciais ao modelo C₄. Conseqüentemente, o local específico da expressão de enzimas do ciclo C₄ e a quantidade acumulada pode precisar apenas de uma modificação, e não de uma nova construção metabólica (Ueno *et al.*, 2003; Covshoff e Hibberd, 2012; Kadereit *et al.*, 2017;

Upadhyay *et al.*, 2020; Sage, 2021). Assim, o estabelecimento de um mecanismo C₄ funcional em uma planta C₃ é uma estratégia com potencial de promover aumentos substanciais na produtividade de culturas de espécies com metabolismo C₃ (Von Caemmerer *et al.*, 2012).

Nesta perspectiva, acredita-se que existe um conjunto mínimo de genes capaz de conferir características de plantas com mecanismo concentrador de CO₂ a plantas com mecanismo fotossintético C₃. Dessa forma, o cruzamento de uma espécie C₃ com uma espécie C₄, ambas da família Cleomaceae, poderia introduzir na espécie C₃ o conjunto de genes necessários para o desenvolvimento da característica C₄. Deste modo, os objetivos desse trabalho foram gerar e analisar híbridos interespecíficos entre as espécies de Cleomaceae C₃ *Tarenaya hassleriana* e *Tarenaya longicarpa*, e a espécie C₄ *Gynandropsis gynandra* e compará-los com seus parentais, a fim de identificar as bases genéticas, metabólicas e fisiológicas para o estabelecimento do mecanismo fotossintético C₄ em espécies de plantas C₃.

1. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Condições de cultivo

Foram utilizadas neste estudo as espécies *Gynandropsis gynandra*, *T. hassleriana* e *Tarenaya longicarpa*, da família Cleomaceae. As três espécies são encontradas na Flora brasileira e possuem características distintas. *G. gynandra* é uma espécie com mecanismo C₄ e genoma nuclear de 2,2 pg; *T. hassleriana*, é C₃ com genoma nuclear de 0,65 pg.; *T. longicarpa*, é uma espécie C₃ que possui um genoma nuclear de 1,3 pg (Parma *et al.*, *submetido*). O genoma duplicado de *T. longicarpa*, juntamente com outras características, indica que esta pode ser uma espécie com metabolismo próximo ao intermediário C₃-C₄ (Parma *et al.*, *submetido*).

As sementes dessas espécies foram obtidas de exemplares coletados em Parques Estaduais e Nacionais ocorrentes no país e recentemente caracterizados (Parma *et al.*, *submetido*). O acesso classificado como *G. gynandra* (espécie herbácea) foi coletado em Mossoró, no estado do Rio Grande do Norte (RN). O acesso de *T. hassleriana* (espécie arbustiva) foi coletado em Domingos Martins, no estado do Espírito Santo (ES). O acesso de *T. longicarpa* (espécie arbustiva) foi coletado em Picos, no estado de Piauí (PI) (Parma *et al.*, *submetido*). As exsicatas dessas espécies foram depositadas no herbário VIC da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Foi germinada uma semente por vaso plástico de 1,16 L, preenchido com substrato comercial Topstrato HT hortaliças© suplementado com 14 g de NPK (4: 14: 8) por vaso [0,56 g de N, 0,86 g de P (P₂O₅), e 0,93 g K (K₂O)] e cultivadas em casa-de-vegetação sob condições semi-controladas (radiação fotossinteticamente ativa máxima de 1.500 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de 20 ± 2 °C) de abril a julho de 2019, sendo irrigadas diariamente. Nestas condições, as plantas permaneceram por um período de quatro meses até florescerem possibilitando a realização dos cruzamentos.

As sementes obtidas de cada cruzamento foram coletadas quando maduras, cerca de quarenta dias após o cruzamento, e colocadas para germinar juntamente com sementes dos parentais, nas mesmas condições de germinação descritas anteriormente e cultivadas em casa-de-vegetação sob as mesmas condições descritas anteriormente com temperatura de 30 ± 2 °C) de agosto a novembro de 2019. Nestas condições, os indivíduos que obtiveram sucesso na germinação e desenvolvimento permaneceram por um período de quatro meses até a determinação dos parâmetros de trocas gasosas e coleta de material vegetal para as análises moleculares, anatômicas e bioquímicas.

2.2. Hibridação interespecífica

Hibridações interespecíficas entre a espécie C₄ *G. gynandra* e as espécies C₃ *T. hassleriana* e *T. longicarpa* foram realizadas na casa de vegetação da Unidade de Crescimento de Plantas do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. Os cruzamentos foram realizados diariamente logo ao amanhecer, horário em que as flores de Cleomaceae abrem. Logo ao florescer foi feita a emasculação das flores na espécie materna, que teve suas anteras completamente removidas para impedir a autofecundação. Em seguida foi feita a polinização do estigma destas flores utilizando pólen recém colhido das anteras de flores da espécie paterna. As combinações de hibridação foram marcadas com diferentes cores de fitas e dados como data e espécies foram anotados.

Portanto, foram realizadas quatro combinações de cruzamentos: *G. gynandra* x *T. longicarpa* (Gg x Tl), *T. longicarpa* x *G. gynandra* (Tl x Gg), *G. gynandra* x *T. hassleriana* (Gg x Th), e *T. hassleriana* x *G. gynandra* (Th x Gg).

2.3. Manutenção dos híbridos interespecíficos

A manutenção dos híbridos foi feita utilizando técnicas de propagação vegetativa. Os híbridos e parentais foram propagados por estaquia para que não houvessem alterações genéticas e para que as plantas se mantivessem viáveis para a realização dos experimentos e análises.

Para a estaquia, ramos completamente desenvolvidos do caule dos indivíduos foram selecionados e seccionados em sua parte mediana formando estacas de aproximadamente 15cm de comprimento que foram colocadas em vasos plásticos de 1,16 L preenchidos por substrato comercial Topstrato HT hortaliças© suplementado como descrito anteriormente para a germinação, onde foram cultivadas sob condições semi-controladas iguais as descritas no item 2.2. Sendo mantidas nessas condições por todo ciclo vegetativo até que houvesse necessidade de nova propagação ao final da fase vegetativa destas plantas.

2.4. Anatomia foliar

A fim de avaliar características anatômicas e um possível início de instalação de uma anatomia Kranz, foi avaliado a densidade de venação, largura das células da bainha do feixe vascular, distancia internerval e espessura foliar dos híbridos e parentais. Para quantificar a densidade de venação, foram coletados o folíolo central de folhas completamente desenvolvidas do terceiro nó com quatro meses de idade. A diafanização do material foliar foi realizada

segundo a metodologia proposta por Zsögön *et al.* (2015), que consiste na incubação das folhas em metanol (95%) por 48 horas e em seguida em ácido láctico (100%). As folhas foram, então, acondicionadas em banho-maria a 60 °C até apresentarem um aspecto completamente translúcido. As amostras foliares foram montadas em lâminas de vidro e as imagens da epiderme adaxial e abaxial obtidas com o auxílio de um sistema de captura de imagem em cores, Axiovision® 105, acoplado ao fotomicroscópio Zeiss Axio Scope A1. A densidade de nervuras foi definida como a medição do comprimento das nervuras numa dada área foliar. A quantificação foi realizada no software Image Pro-Plus® (versão 4.5, Media Cybernetics, Silver Spring, EUA).

Para o corte transversal, o folíolo central de folhas totalmente expandidas do terceiro nó com quatro meses de idade foram coletadas e fixadas em FAA50 (formaldeído, ácido acético, etanol 50% na proporção de 5:5:9 v/v), por 48h, desidratadas em série etanólica e incluídas em historesina (Leica, Heidelberg, Germany). O material foi cortado transversalmente (5 µm) em micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2155, LEICA, Heidelberg, Germany), com a utilização de navalhas de vidro. As secções foram coradas com azul de toluidina a 0,05% em tampão acetato pH 4,7 (O'Brien, Feder, e McCully, 1964) por 1 min, e montadas entre lâminas e lamínulas. As fotomicrografias foram obtidas em fotomicroscópio Zeiss (MC-80), com as escalas micrométricas fotografadas e ampliadas nas mesmas condições ópticas. A quantificação da distância internerval, espessura foliar e diâmetro das células da bainha do feixe vascular foram realizadas utilizando o software Image Pro-Plus®.

2.5. Parâmetros de trocas gasosas e fluorescência

Folíolo central de folhas totalmente expandidas do terceiro nó de plantas sem flores com quatro meses de idade foram usados para avaliação de troca gasosa com IRGA LICOR 6400XT (LI-COR Biosciences, Lincoln, EUA). As medições foram realizadas a uma taxa de fluxo de 400 µmol CO₂ s⁻¹ e intensidade luminosa de 1000 µmol fótons m⁻² s⁻¹. Todas as medidas foram realizadas usando uma câmara foliar de 2 cm² a 25 °C. O déficit de pressão de vapor folha-ar foi mantido em 1,2- 2,0 kPa, e a quantidade de luz azul foi definida para 10% da densidade do fluxo de fótons fotossintético (PPFD) para otimizar a abertura estomática. Parâmetros de fluorescência foram quantificados no período da manhã entre 10 e 12 horas, conforme descrito anteriormente (Yin *et al.*, 2009). Respiração noturna (Rd) foi medida usando o mesmo sistema de troca gasosa descrito acima, após incubação de pelo menos 1 hora no escuro ao final do dia. A Rd foi dividida por dois para estimar a taxa de respiração mitocondrial na luz.

Para uma análise fisiológica dos acessos híbridos e seus parentais C₃ e C₄ foram determinadas as curvas de resposta da fotossíntese (A) a diferentes concentrações internas de CO₂ (C_i). As curvas de resposta foram iniciadas com concentração interna de CO₂ de 400 μmol mol⁻¹ e PPFD de 1000 μmol m⁻² s⁻¹. Em seguida, o C_i foi reduzido até 0 μmol mol⁻¹ e depois elevado gradualmente até 1200 μmol mol⁻¹ (totalizando 12 valores de C_i diferentes: 400, 300, 200, 100, 75, 50, 25, 0, 600, 800, 1000, 1200).

2.6. Seleção de linhas híbridas promissoras

No processo de hibridação cada indivíduo da população F1 possui características fenotípicas distintas devido ao alto nível de segregação no cruzamento, portanto foi necessária uma seleção inicial dentre os indivíduos baseada nas características de interesse. Após realizadas as primeiras análises genéticas, anatômicas e de trocas gasosas nos híbridos da população F1, foi feita uma seleção dentre as linhas híbridas tendo como referência o ponto de compensação de CO₂ destas. Com base nesse parâmetro, diretamente relacionado com mecanismo concentrador de CO₂, foram selecionadas três linhas híbridas (TlxGg 02, TlxGg 04 e TlxGg 05) para as demais análises.

Foram produzidas plantas a partir de cinco estacas de cada genótipo das linhas híbridas selecionadas conforme descrito no item 2.3. Formando ao final um experimento inteiramente casualizado com cinco genótipos (três híbridos e dois parentais) e cinco repetições, totalizando 25 indivíduos. As estacas foram mantidas em casa de vegetação por quatro meses, com irrigação diária, até que se desenvolvessem possibilitando a realização das análises posteriores. Após isso foram feitas análises genéticas, anatômicas e de trocas gasosas como descrito anteriormente e adicionadas as análises descritas a seguir.

2.7. Análises bioquímicas

Para as análises bioquímicas, discos foliares do folíolo central, sem conter nervuras, da terceira folha totalmente expandida com quatro meses foram coletados em quatro horários distintos do dia: (i) 15 minutos antes do nascer do sol, (ii) ao meio do período de luz, (iii) ao pôr do sol e (iv) novamente 15 minutos antes do nascer do sol. Após a coleta, os discos foliares foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenado a -80°C, até a realização das análises. A partir de material foliar liofilizado, os metabólitos foram extraídos pela adição de extratores apropriados conforme descrito por Fernie *et al.*, (2001). Aproximadamente 15 mg da matéria foliar liofilizada foram submetidos à extração etanólica a

70 ° C, por 30 minutos. Após a centrifugação (a 21.800 rpm por 5 min), o conteúdo de clorofila foi determinado conforme descrito anteriormente (Porra *et al.*, 1989). O conteúdo total de clorofila ($a + b$) e razão clorofila a/b foram calculados (Porra *et al.*, 1989).

A concentração de glicose, frutose e sacarose foi determinada a partir da fase líquida, conforme descrito anteriormente (Ferne *et al.*, 2001). Os conteúdos de aminoácidos livres totais (Cross *et al.*, 2006), malato (Nunes-Nesi *et al.*, 2007) foram determinados conforme descrito anteriormente. A partir da fração insolúvel em etanol, a concentração de amido (Ferne *et al.*, 2001) e as proteínas solúveis totais (Bradford, 1976) foram determinadas de acordo com protocolos padrão.

2.8. Análises de perfil metabólico

Para determinação do perfil metabólico, discos foliares do folíolo central, sem conter nervuras, da terceira folha totalmente expandida com quatro meses foram coletados no meio do período com luz. As plantas estavam em fase vegetativa, antes de iniciar o período de florescimento, sob condições de cultivo em casa de vegetação, sob condições controladas (radiação fotossinteticamente ativa máxima de $1.500 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de $30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) e irrigação diária.

Após a coleta, os discos foliares foram imediatamente congelados em nitrog\u00e9nio l\u00edquido e, em seguida, armazenados a -80°C , at\u00e9 a realiza\u00e7\u00e3o das an\u00e1lises. Para as an\u00e1lises, aproximadamente 15 mg do tecido vegetal armazenado foi al\u00edquotado e pesado em balan\u00e7a de precis\u00e3o e, posteriormente, os metab\u00f3litos foram extra\u00eddos para an\u00e1lise por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS) de acordo com Fiehn *et al.*, (2000) usando um 7200 GC-QTOF (Agilent, Santa Clara, EUA). A an\u00e1lise dos dados foi realizada com o software Mass Hunter (Agilent, Santa Clara, EUA). Para quantifica\u00e7\u00e3o relativa, todas as \u00e1reas do pico do metab\u00f3lito foram normalizadas para a \u00e1rea do pico do ribitol, um padr\u00e3o interno adicionado antes da extra\u00e7\u00e3o. Os dados de GC-MS foram normalizados para facilitar a compara\u00e7\u00e3o dos diversos metab\u00f3litos entre h\u00edbridos e parentais. Para isso a m\u00e9dia de cada metab\u00f3lito de *G. gynandra* foi dividida pela m\u00e9dia de cada metab\u00f3lito de *T. longicarpa*, TlxGg02, TlxGg 04 e TlxGg 05. Assim todos os valores observados podem ser interpretados como em rela\u00e7\u00e3o a esp\u00e9cie *G. gynandra*, seguindo as recomenda\u00e7\u00f5es de formato (Ferne *et al.*, 2011).

2.9. Composi\u00e7\u00e3o isot\u00f3pica do carbono

As composições isotópicas do carbono e nitrogênio das amostras foram determinadas a partir de uma alíquota de 1 mg de material foliar seco. Para esta análise utilizou-se o folíolo central, sem conter nervuras, da terceira folha totalmente expandida de plantas com quatro meses, coletados ao meio dia. Após a coleta o material foliar foi seco em estufa a 70°C, onde permaneceram por quinze dias até estarem completamente secos. Após a secagem, as amostras foram armazenadas em um dessecador até a realização das análises.

As amostras foram analisadas por combustão sob fluxo contínuo de hélio, em um analisador elementar acoplado ao espectrômetro de massa conforme descrito por Gowik *et al*, (2011). Os gases CO₂ e N₂, resultantes da combustão foram analisados. As razões isotópicas foram expressas pela notação delta (δ), em partes por mil (‰) e calculados pela seguinte fórmula:

$$\delta \text{ amostra}^{\text{‰}} = [(R \text{ amostra} - R \text{ padrão}) / R \text{ padrão}] \times 1000$$

2.10. Auto cruzamento dos híbridos e análise da geração F2

As linhas híbridas selecionadas TlxGg 02, TlxGg 04 e TlxGg 05 se desenvolveram e atingiram a fase reprodutiva possibilitando o auto cruzamento destes e desenvolvimento de uma população F2. O auto cruzamento foi realizado manualmente, para a polinização, o estigma da flor de cada planta foi polinizado com pólen da mesma planta. As sementes formadas foram coletadas, armazenadas em temperatura ambiente por noventa dias e colocadas para germinar em sementeiras de plástico contendo 50 células cada, preenchidas com substrato comercial Topstrato HT hortaliças© e cultivadas em casa-de-vegetação sob condições semi-controladas idênticas ao descrito no item 2.3.

Para avaliar o percentual de germinação das sementes oriundas do auto cruzamento dos híbridos e dos parentais como controle, medições de número de sementes germinadas foram feitas a cada três dias, durante 60 dias. Foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram protrusão da raiz. As variáveis calculadas foram as seguintes: Germinação (G), calculada pela fórmula $G = (N/100) \times 100$, em que, N = número de sementes germinadas ao final do teste; Índice de velocidade de germinação (IVG), calculado pela fórmula $IVG = \sum (n_i / t_i)$, em que: n_i = número de sementes que germinaram no tempo 'i'; t_i = tempo após instalação do teste; $i = 1 \rightarrow 60$ dias. Unidade: adimensional; Tempo médio de germinação (TMG), calculado pela fórmula $TMG = (\sum n_i t_i) / \sum n_i$, em que: n_i = número de sementes germinadas por dia; t_i = tempo de incubação; $i = 1 \rightarrow 60$ dias. Unidade: dias. - Velocidade média de germinação (VMG), calculada pela fórmula $VMG = 1/t$ em que, t = tempo médio de germinação. Unidade: dias¹.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com cinco genótipos e cinco repetições. Cada parcela experimental foi constituída de 10 sementes, totalizando 250 sementes analisadas.

2.11. Análises estatísticas

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância e comparados por teste de Tukey utilizando o algoritmo contido no software Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Seattle, WA, EUA), sendo considerados significantes os valores com $P < 0,05$. Os resultados obtidos também foram submetidos a uma análise multivariada utilizando o método de Análise dos componentes principais com análise de fator utilizando o software Statistica, a fim de separar os genótipos em subgrupos com características semelhantes.

3. RESULTADOS

3.1. Híbridações interespecíficas entre espécies de Cleomaceae

Para investigar as bases da variabilidade genética existentes em diferentes tipos de mecanismos fotossintéticos foram realizadas híbridações entre duas espécies C_3 (*T. hassleriana* e *T. longicarpa*) e uma espécie C_4 (*G. gynandra*) da família Cleomaceae. Foram realizadas quatro combinações de híbridações *T. hassleriana* x *G. gynandra*, *G. gynandra* x *T. hassleriana*, *T. longicarpa* x *G. gynandra* (Tl x Gg) e *G. gynandra* x *T. longicarpa* (Gg x Tl) (Figura 1). Os cruzamentos foram bem sucedidos, gerando inúmeros frutos com várias sementes e plantas capazes de atingir a etapa reprodutiva. Dentre as quatro combinações de híbridações todas apresentaram capacidade de germinação, exceto a híbridação Gg x Tl, que dentre as sementes formadas nenhuma germinou. As sementes provenientes dos cruzamentos Th x Gg e Gg x Th foram capazes de germinar, porém as plântulas resultantes não se desenvolveram, senescendo antes mesmo da fase reprodutiva. O desenvolvimento completo, até a fase reprodutiva, foi observado apenas em plantas provenientes do cruzamento entre Tl x Gg.

A observação dos híbridos resultantes do cruzamento Tl x Gg sugere que a forma das folhas e hábitos de crescimento nem sempre ocorrem de forma intermediária a seus parentais, nem uniformes entre si. Algumas plantas apresentaram fenótipo semelhante a *T. longicarpa*, outras apresentaram folhas fenotipicamente diferentes dos parentais, o que era esperado devido à alta heterozigosidade entre os parentais e diferentes características anatômicas (Figura 2). Dentre os híbridos deste cruzamento haviam seis linhas aparentemente em melhores condições de nutrição e desenvolvimento, estes seis híbridos foram caracterizados em termos anatômicos e fotossintéticos.

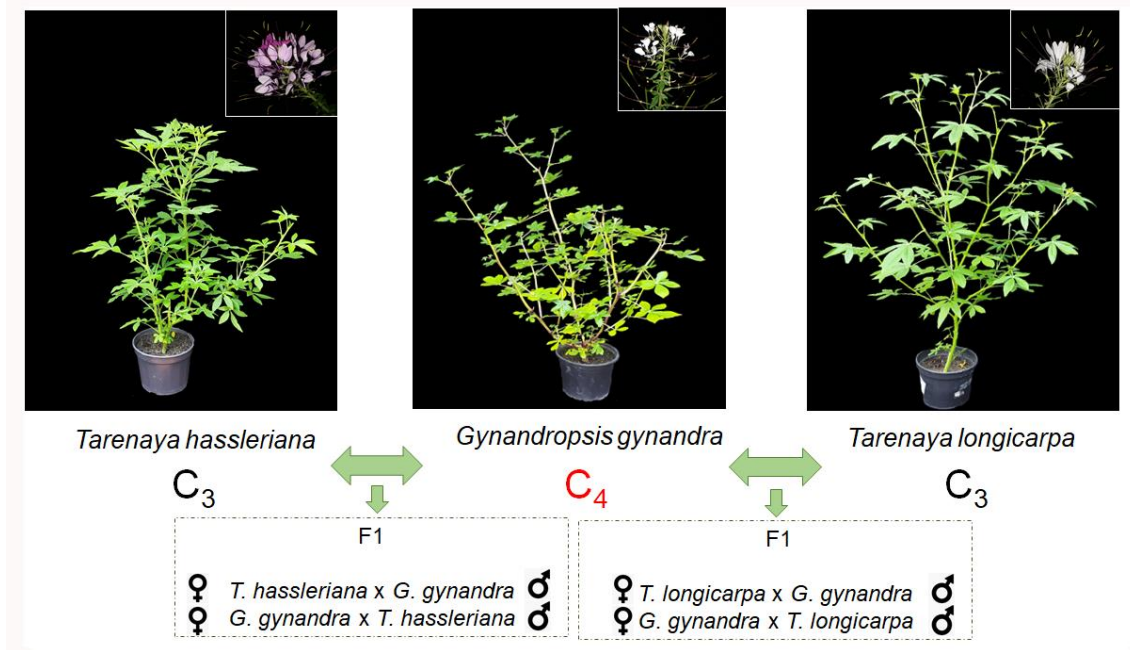


Figura 1. Esquema representando os cruzamentos entre as espécies *Tarenaya hassleriana* e *Tarenaya longicarpa* (C₃) e *Gynandropsis gynandra* (C₄). Morfoespécies estudadas: *T. hassleriana* (Domingos Martins – ES); *T. longicarpa* (Picos – PI); *G. gynandra* (Mossoró – RN).

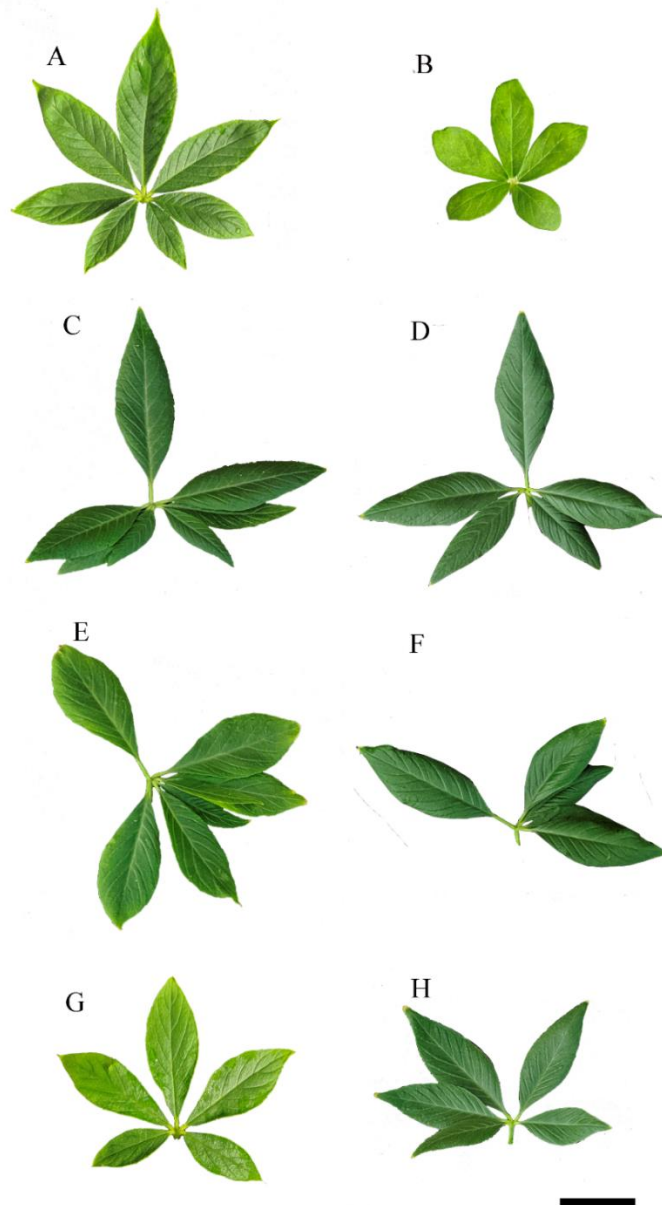


Figura 2: Variações fenotípicas em folhas de diferentes espécies de Cleomaceae e suas linhas híbridas interespecíficas resultantes. A- *T. longicarpa*. B- *G. gynandra*. C, D, E, F, G e H: Híbridos interespecíficos entre *T. longicarpa* e *G. gynandra*. Barra = 1 cm.

3.2. Caracterização fenotípica das linhagens híbridas

A fenotipagem das plantas provenientes do cruzamento entre *T. longicarpa* como espécie materna e *G. gynandra* como espécie paterna demonstrou que os indivíduos gerados são diferentes dos parentais, embora com maior grau de semelhança ao parental C₃. Verificou-se que o ponto de compensação de CO₂ de *G. gynandra* e *T. longicarpa* variou entre 4 e 70 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂, respectivamente. Já as linhagens híbridas apresentaram variações em seus pontos de compensação de CO₂, de 44 a 83 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (Figura 3A). Algumas linhagens

apresentaram diferenças significativas quando comparadas aos parentais, embora ainda que mais próximos do parental C₃ (Figura 3A).

Em relação a características anatômicas, espécies C₄ apresentam maior densidade de venação, menor distância internerval e células da bainha do feixe vascular mais largas em relação a espécies C₃. Os híbridos apresentaram maior densidade de venação do que seus parentais (Figura 3B). Enquanto valores intermediários mais próximos do parental C₄ foram encontrados para largura das células da bainha do feixe vascular (Figura 3C) e distância internerval (Figura 3D).

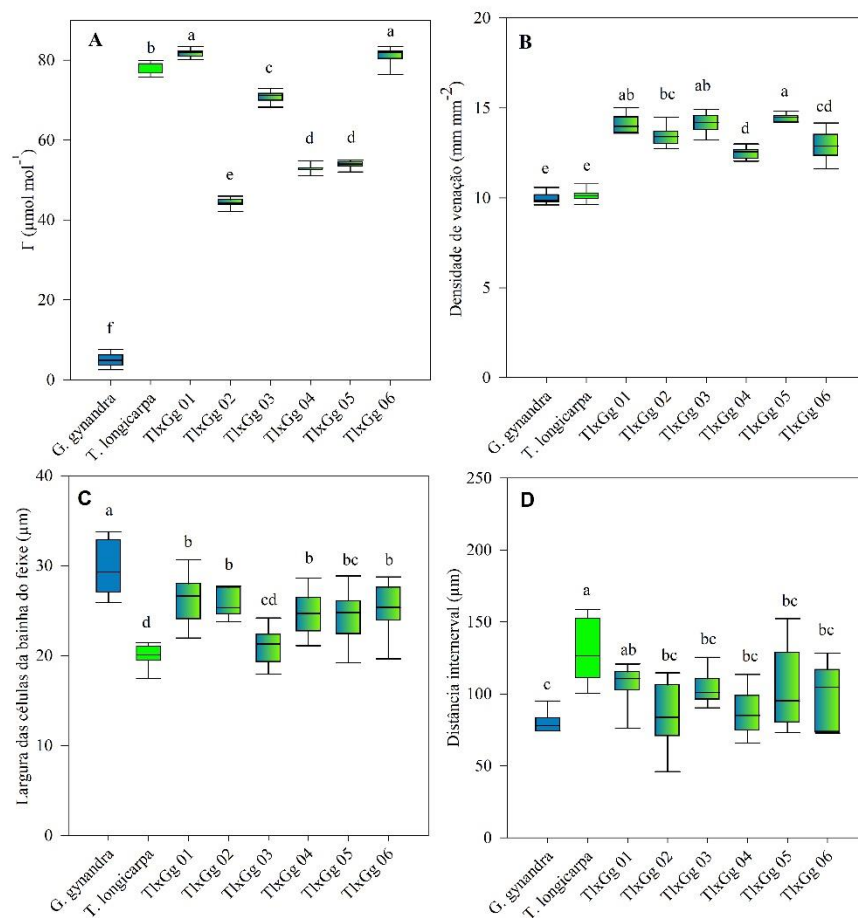


Figura 3. Variação natural de características anatômicas e parâmetros de trocas gasosas em folhas completamente expandidas do terceiro nó de plantas com quatro meses de idade das espécies *T. longicarpa* (C₃), *G. gynandra* (C₄) e seus híbridos interespecíficos. A, ponto de compensação de CO₂. B, densidade de venação. C, largura das células da bainha do feixe vascular. D, distância internerval. Letras acima da dispersão de caixas individuais indicam agrupamentos significativos de acordo com o Teste de Tukey ($P < 0,05$; $n = 5$). A mediana é indicada por linhas sólidas em cada caixa, a dispersão de dados é representada pelo intervalo interquartil.

Entre as linhas de híbridos analisadas na geração F1, verificou-se variação no ponto de compensação de CO₂ e características anatômicas. Essas diferenças entre os indivíduos se dão, provavelmente, à heterozigosidade de suas espécies parentais. Assim, foi necessário a seleção de linhas híbridas mais promissoras em termos de introdução de características de plantas de C₄ para análises detalhadas das populações subsequentes na geração F2. Assim, foram selecionadas três linhas híbridas com fenótipos divergentes em termos de ponto de compensação de CO₂ e parâmetros anatômicos (TlxGg 02, TlxGg 04 e TlxGg 05). Essas três linhas híbridas apresentaram fenótipos foliares distintos (Figura 4A), venação foliar semelhantes (Figura 4B) e apresentaram também diferenças nas características anatômicas observadas em cortes transversais (Figura 4C). Tais características anatômicas foram posteriormente quantificadas.

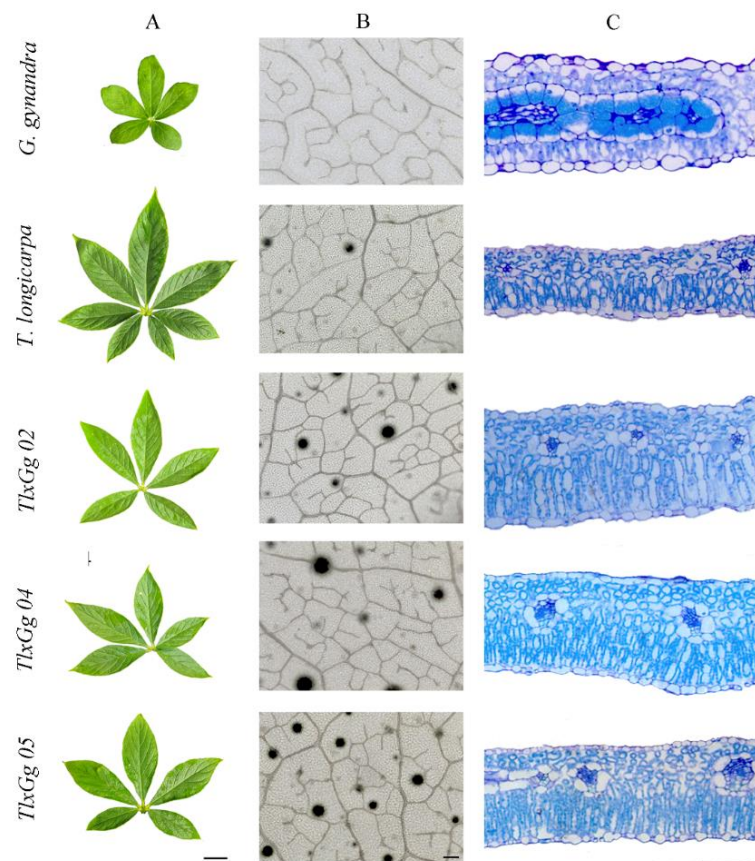


Figura 4. Variação em características anatômicas de folhas completamente expandidas do terceiro nó de plantas com quatro meses de idade das espécies *T. longicarpa* (C₃), *G. gynandra* (C₄) e seus híbridos interespecíficos. A, folhas completamente expandidas das espécies *T. longicarpa* (C₃), *G. gynandra* (C₄) e seus híbridos interespecíficos (Barras = 1 cm). B, folhas de secção transversal da espécie Cleomaceae e híbridos interespecíficos (10x; barras = 100 μm). C, densidade de venação em folhas de espécies Cleomaceae e híbridos interespecíficos (10x. Barras = 100 μm).

3.3. Avaliação dos parâmetros anatômicos e de trocas gasosas

Após a seleção, as linhas híbridas e os parentais foram propagadas por estacas e quatro meses após a estaquia as plantas foram submetidas a análises de trocas gasosas e fluorescência, em paralelo com análises anatômicas com intuito de confirmar as características divergentes entre os mecanismos fotossintéticos C₃ e C₄. Neste novo experimento, o ponto de compensação de CO₂ de *G. gynandra* e *T. longicarpa* variou de 7 e 68 $\mu\text{mol mol}^{-1}$, respectivamente. As linhas híbridas TlxGg 02, TlxGg 04 e TlxGg 05 apresentaram 55, 53 e 56 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ em seus pontos de compensação de CO₂, redução significativa de 19%, 22% e 18%, respectivamente, em comparação com plantas da espécie C₃, *T. longicarpa* (Figura 5A). Os resultados observados neste novo experimento se assemelham aos resultados obtidos no inicialmente no primeiro experimento.

As linhas híbridas apresentaram valores intermediários significantes na largura das células da bainha do feixe vascular quando comparados à seus parentais, sendo estes valores mais próximos ao parental C₄ (Figura 5B). Em relação à distância internerval as linhas TlxGg 04 e TlxGg 05 se assemelham com ao parental *G. gynandra*, enquanto a linha TlxGg 02 não diferiu dos parentais (Figura 5C). Já para densidade de venação não foram observadas diferenças entre as linhas TlxGg 02, TlxGg 04, TlxGg 05 e parentais (Figura 5D). Por fim, foi avaliada a espessura foliar, onde as três linhas híbridas foram semelhantes a *T. longicarpa* demonstrando uma menor espessura foliar do que a *G. gynandra* (Figura 5F).

Adicionalmente foram avaliados parâmetros associados à características hidráulicas das plantas. Para isso, em adição as análises anatômicas, foi avaliada também a área foliar específica (AFE), esta revelou valores semelhantes para a linha híbrida TlxGg 02 quando comparada a *G. gynandra*. Enquanto as linhas TlxGg 04 e TlxGg 05 não se diferiram de nenhum dos parentais (Figura 5E).

Com o objetivo de compreender melhor as divergências entre as espécies parentais *T. longicarpa* e *G. gynandra* e as linhas híbridas, foram avaliados alguns parâmetros de trocas gasosas e fluorescência. Em todos os parâmetros analisados os híbridos apresentaram valores semelhantes ao parental *T. longicarpa*, e diferentes da *G. gynandra*, que apresentou maior eficiência fotossintética (Figura 6 A-E). Exceto para respiração noturna que não diferiu entre híbridos e parentais (Figura 6F).

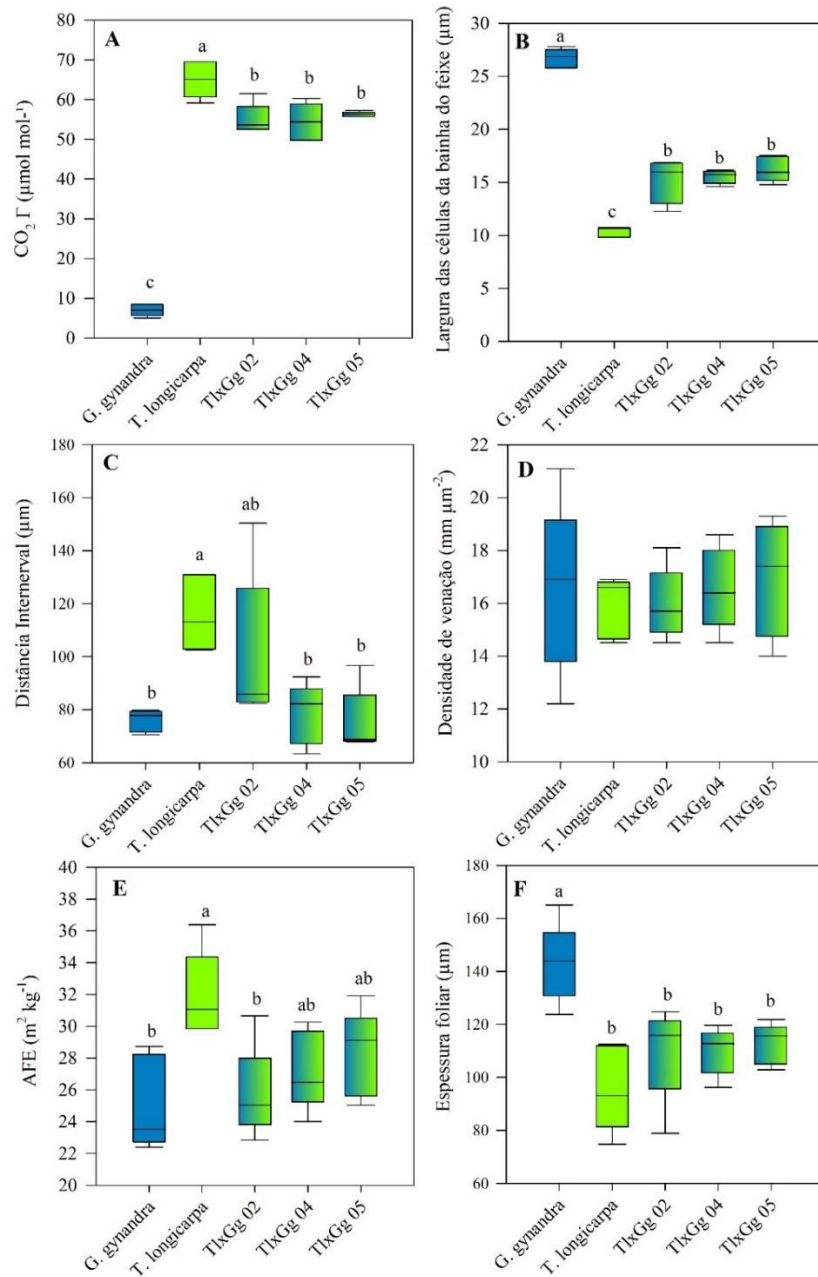


Figura 5. Variação em características anatômicas e parâmetros de trocas gasosas em folhas completamente expandidas do terceiro nó de plantas com quatro meses de idade das espécies *T. longicarpa* (C_3), *G. gynandra* (C_4) e seus híbridos interespecíficos. A, ponto de compensação de CO_2 . B, largura das células da bainha do feixe vascular. C, distância internerval. D, densidade de venação. E, área foliar específica. F, espessura foliar. Letras acima da dispersão de caixas individuais indicam agrupamentos significativos de acordo com o Teste de Tukey, ($P < 0,05$; $n=5$). A mediana é indicada por linhas sólidas em cada caixa, a dispersão de dados é representada pelo intervalo interquartil.

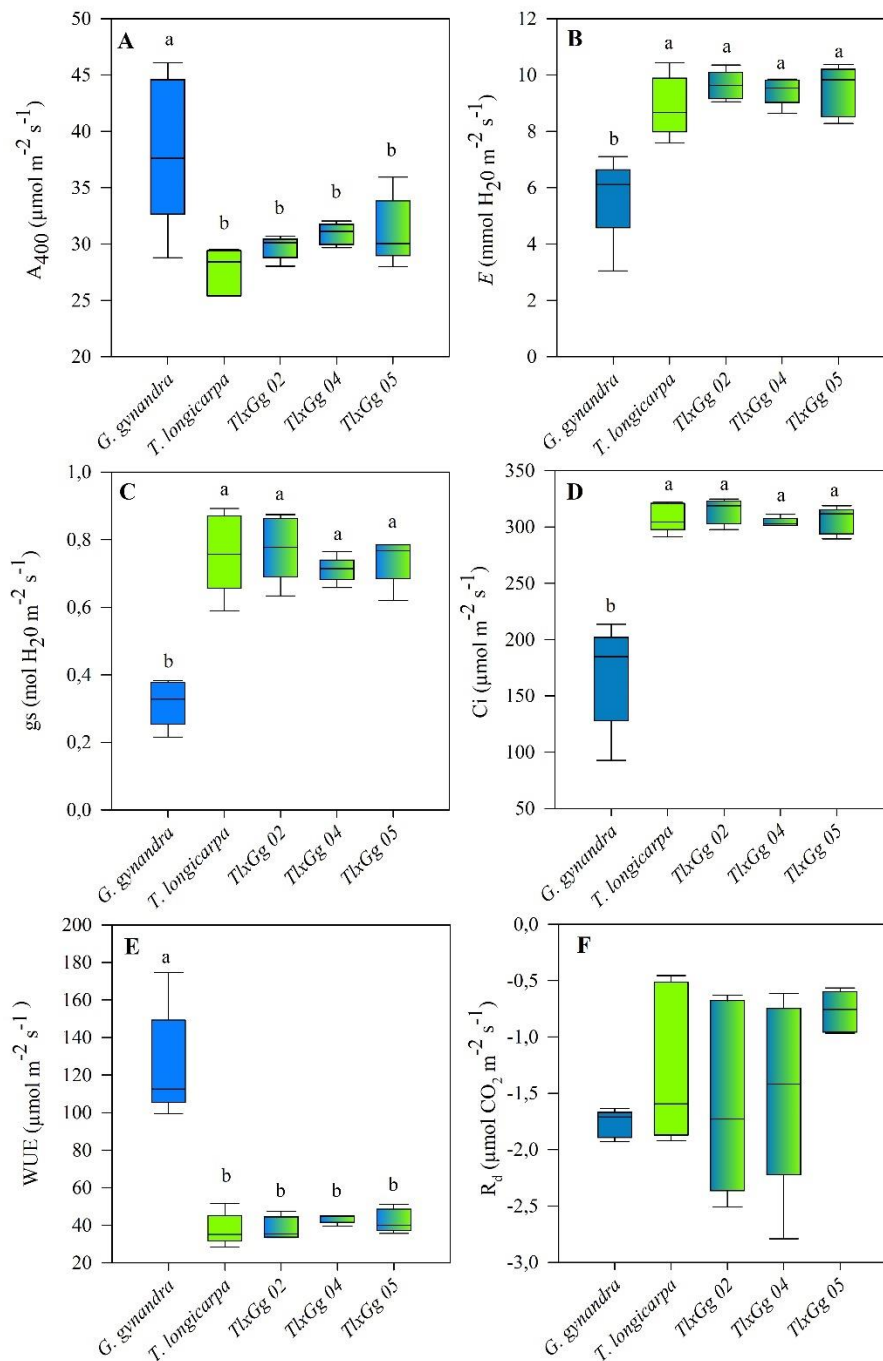


Figura 6. Parâmetros de trocas gasosas e fluorescência em folhas completamente expandidas do terceiro nó de plantas com quatro meses de idade das espécies *T. longicarpa* (C₃), *G. gynandra* (C₄) e seus híbridos interespecíficos. A, taxas de assimilação de CO₂ ambiente (A) (400 ppm atmosféricos [CO₂]). B, transpiração (E). C, condutância estomática (g_s). D, concentração de carbono interno (C_i). E, eficiência na utilização da água (WUE). F, respiração noturna (R_d). Letras acima da dispersão de caixas individuais indicam agrupamentos significativos de acordo com o Teste de Tukey, ($P < 0,05$; $n = 5$). A mediana é indicada por linhas sólidas em cada caixa, a dispersão de dados é representada pelo intervalo interquartil.

3.4. Avaliação de parâmetros bioquímicos

A fim de compreender as diferenças entre os parentais e os híbridos, avaliou-se os níveis de metabólitos relacionados aos metabolismos do carbono e nitrogênio em folhas completamente expandidas no meio do período de luz (Figura 7). Apesar da variação nos parâmetros fisiológicos, as linhas híbridas foram semelhantes a espécie *T. longicarpa* nos níveis de açúcares solúveis (glicose e sacarose), amido e relação clorofila *alb* (Figura 7C, D, F, H). Os níveis de aminoácidos livres totais foram inferiores nos híbridos em comparação com os dois parentais (Figura 7A). Por sua vez, as folhas de plantas de *G. gynandra* apresentaram maiores níveis de açúcares solúveis e amido quando comparado a *T. longicarpa* e híbridos. Em relação aos níveis de proteína solúvel total, frutose e malato não foram observadas diferenças entre parentais e híbridos (Figura 7 B, E, G).

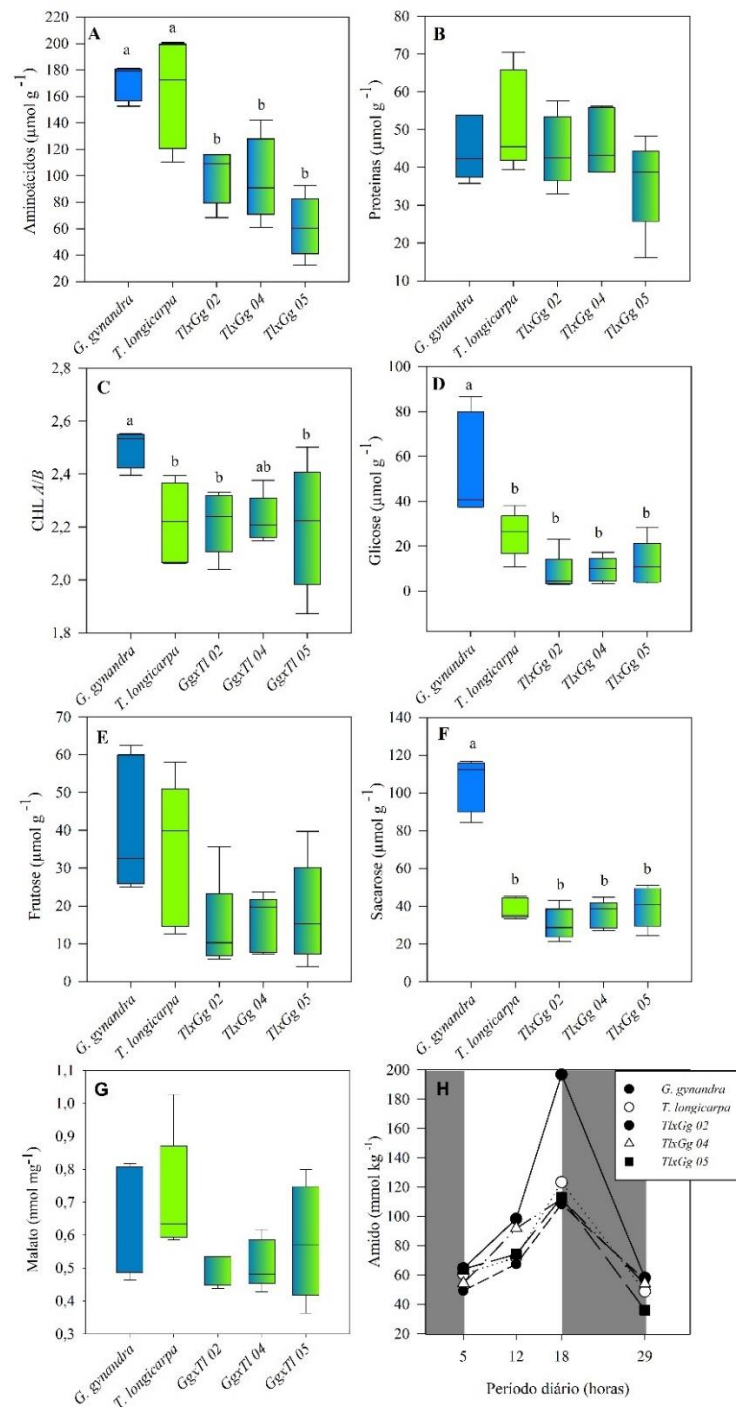


Figura 7. Níveis de metabólitos extraídos de folhas completamente expandidas do terceiro nó de plantas com quatro meses de idade das espécies *T. longicarpa* (C_3), *G. gynandra* (C_4) e seus híbridos interespecíficos. Para todas as análises metabólicas exceto os níveis de amido, as amostras de folhas com quatro meses de idade foram colhidas a meio do dia. A, aminoácidos livres totais; B, proteínas solúveis totais; C, razão entre clorofilas *a/b*; D, glicose; E, frutose; F, sacarose; G, malato; H, níveis de amido ao longo do dia; Letras acima da dispersão de caixas individuais indicam agrupamentos significativos de acordo com o Teste de Tukey, ($P < 0,05$; $n = 5$). A mediana é indicada por linhas sólidas em cada caixa, a dispersão de dados é representada pelo intervalo interquartil.

3.5. Variações no perfil metabólico de folhas

Para ter uma visão ampla do metabolismo em folhas iluminadas de plantas de linhas parentais e híbridas, foi avaliado o perfil metabólico por cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa (GC-MS). Esta análise permitiu a identificação e quantificação de 36 metabólitos pertencentes a diferentes classes de compostos (Figura 8A). Os níveis dos metabólitos analisados foram relativizados e comparados em relação a espécie *G. gynandra*, por ser uma espécie amplamente caracterizada (Sogbohossou *et.al.*, 2019; Parma *et al.*, *submetido*). Para maioria dos metabólitos analisados não foram observadas diferenças entre os cinco genótipos avaliados (Figura 8A). Entretanto, observou-se menores níveis de fenilalanina em folhas de *G.gynandra* em comparação com *T. longicarpa* e híbridos. As linhas TlxGg 02 e 04 apresentaram menores níveis de triptofano quando comparadas a *G. gynandra*. Verificou-se também maiores níveis de citrato + isocitrato, isocitrato e chiquimato em folhas de *G. gynandra* em comparação com os outros genótipos. Em relação aos açúcares, observou-se que a linha híbrida TlxGg 05 apresentou maiores níveis de maltose em comparação com *G. gynandra*; já as demais linhas não diferiram em relação aos dois parentais. Maiores níveis de rafinose foram observados em *G. gynandra* em relação a *T. longicarpa* e híbridos. Adicionalmente, foram observados níveis reduzidos de mio-inositol e sinapinato em folhas da espécie *G. gynandra*.

Os dados de perfil metabólico foram submetidos a uma análise de componentes principais (PCA) a fim de averiguar o quanto as diferenças entre os níveis de metabólitos contribuíram para a diferenciação entre as linhagens híbridas e parentais (Figura 8B). De forma interessante, o resultado da análise sugere que as alterações no perfil metabólico de folhas de plantas híbridas, apesar de pequenas, foram suficientes para separar *G. gynandra*, *T. longicarpa* das linhas híbridas (Figura 8B).

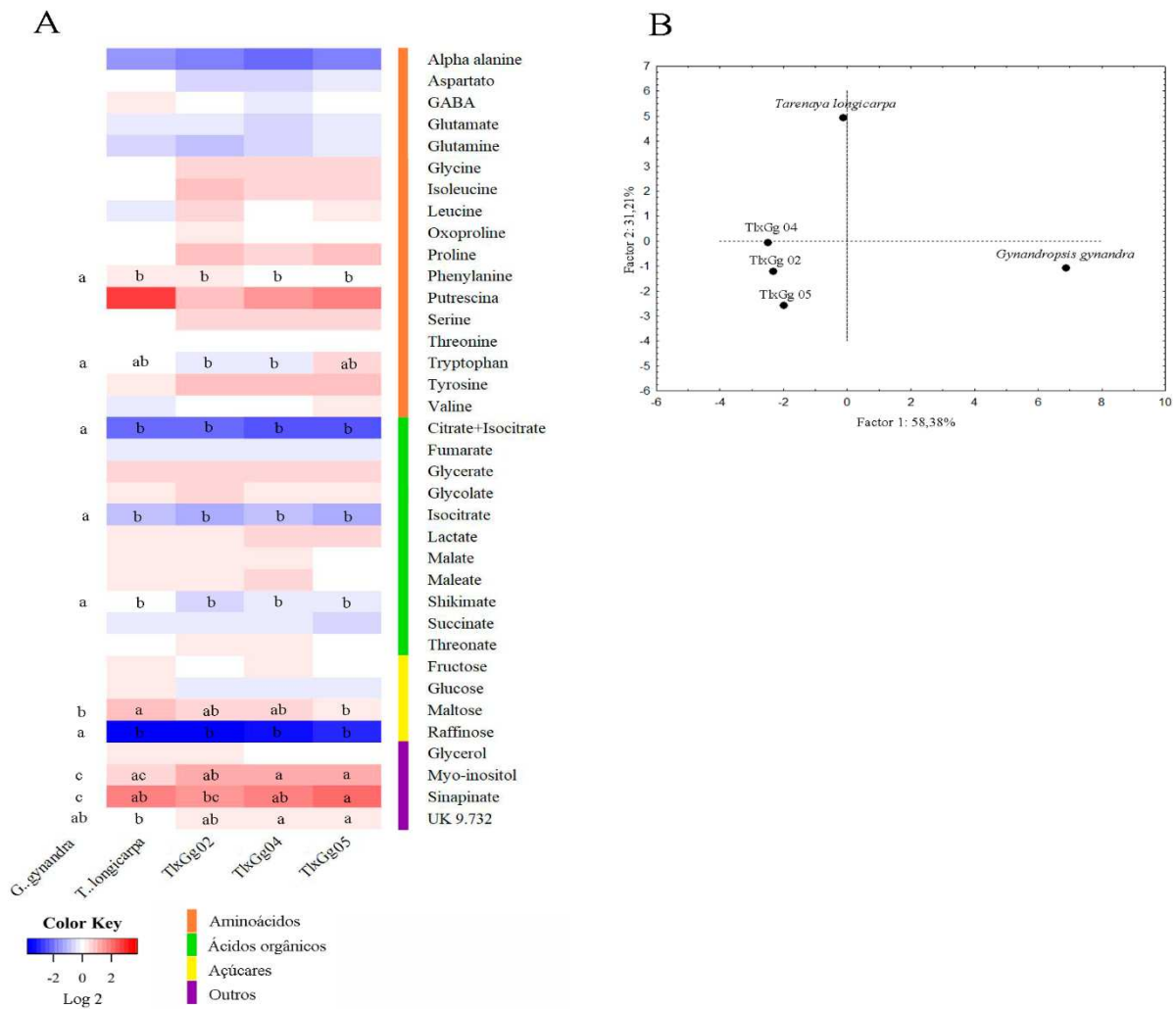


Figura 8. **A)** A, mapa de cores ilustrando as alterações no conteúdo relativo de metabólitos em folhas das espécies *T. longicarpa*, *G. gynandra* e linhagens híbridas coletadas no meio do período de luz. Para análise foram coletadas folhas completamente expandidas de plantas com quatro meses de idade, antes do florescimento. Os dados de GC-MS foram normalizados pela média dos valores de cada metabólito da espécie *G. gynandra*. As letras indicam diferenças significativas de acordo com o Teste de Tukey ($P < 0,05$; $n = 5$). **B)** Análise de componentes principais (PCA) representando as alterações no teor relativo de metabólitos ao meio dia, via análise por GC-MS. Para análise foram utilizadas folhas completamente expandidas de plantas com quatro meses de idade de *T. longicarpa* (C₃), *G. gynandra* (C₄) e seus híbridos interespecíficos.

3.6. Composição isotópica do carbono

A composição isotópica de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) das plantas tem sido amplamente utilizada para indicar os diferentes mecanismos fotossintéticos (Caemmerer *et al.*, 2014). Assim, os valores de $\delta^{13}\text{C}$ foram avaliados em folhas completamente expandidas dos híbridos e parentais (Figura 9A). Esta análise revelou taxas de $\delta^{13}\text{C}$ de -31‰ para *T. longicarpa*, semelhante as linhas híbridas que obtiveram cerca de -28‰, em contrapartida o valor observado em *G. gynandra* foi

claramente mais baixo, cerca de -13% , valor típico de espécies C_4 (Yang et al., 2017). A concentração interna de carbono não variou entre as linhas híbridas e parentais (Figura 9B). Já a concentração interna de nitrogênio foi relativamente menor em *G. gynandra* do que em *T. longicarpa* e nas linhas híbridas (Figura 9C). Seguindo o padrão da concentração interna de nitrogênio, a relação carbono/nitrogênio da *G. gynandra* foi maior do que a da *T. longicarpa* e linhas híbridas (Figura 9D).

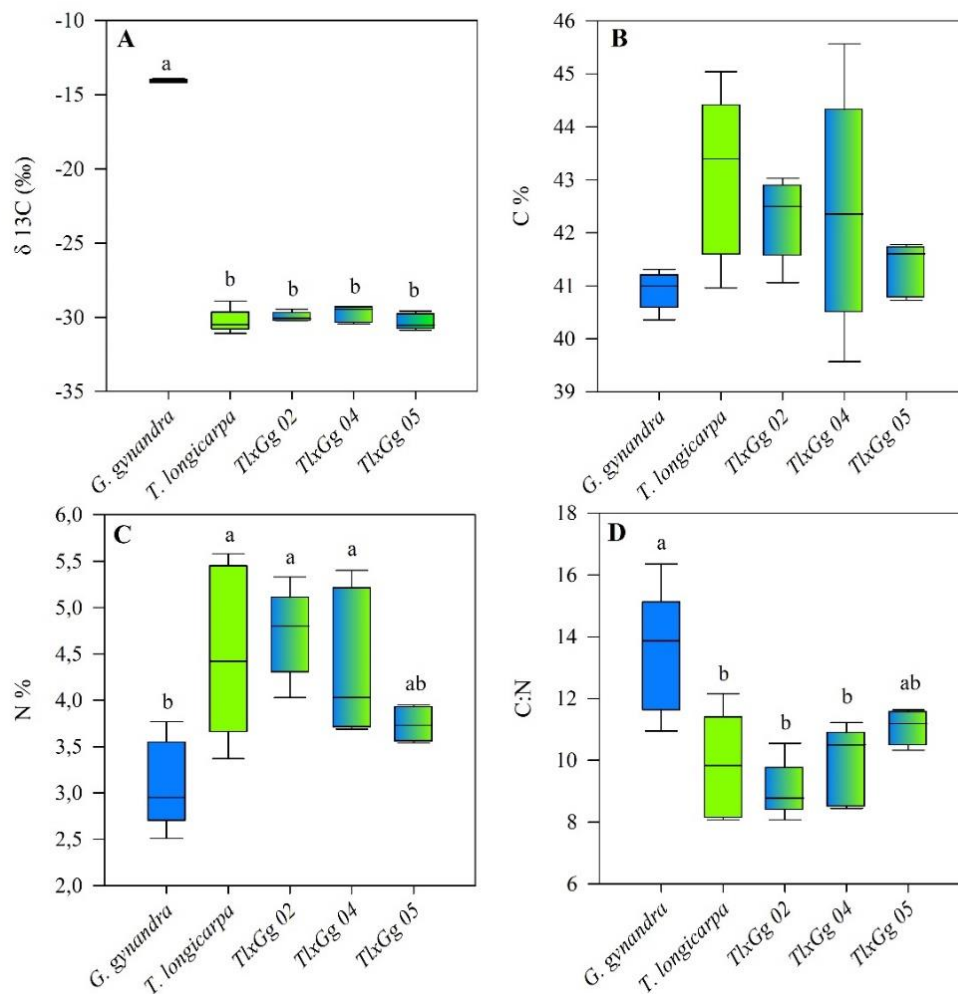


Figura 9. Níveis de metabólitos e composição isotópica do carbono de folhas completamente expandidas do terceiro nó de plantas com quatro meses de idade das espécies *T. longicarpa* (C_3), *G. gynandra* (C_4) e seus híbridos interespecíficos. Para todas as análises metabólicas, as amostras de folhas foram colhidas a meio do dia. A, composição isotópica do carbono ($\delta^{13}C$; ‰); B, taxa de carbono (C%); C, taxa de nitrogênio (N%); D, taxa de carbono/nitrogênio (C:N). A mediana é indicada por linhas sólidas em cada caixa, a dispersão de dados é representada pelo intervalo interquartil. As letras indicam diferenças significativas de acordo com o Teste de Tukey ($P < 0,05$; $n=5$).

3.7. Geração e análise da população F2

Com o objetivo de avaliar a estabilidade dos fenótipos observados nas linhas híbridas bem como a viabilidade de sementes da população F2 para estudos subsequentes foi realizada a autopolinização dos híbridos e, com as sementes obtidas, foram avaliados parâmetros básicos de germinação como porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação (IVG), tempo médio de germinação (TMG) e velocidade média de germinação (VMG) ao final de 60 dias após a semeadura (Figura 10). A taxa de germinação obtida nas sementes dos parentais foi de 66% para *G. gynandra* e 60% para *T. longicarpa*. As sementes oriundas das linhas TlxGg 02, TlxGg04 e TlxGg 05 apresentaram taxa de germinação de 38%, 4% e 40% respectivamente. Na avaliação dos índices IVG, TMG e VMG, as linhas híbridas TlxGg 02 e TlxGg 05 não diferiram significativamente dos parentais, tendo ao final uma velocidade média de germinação de 30 a 35 dias. A linha TlxGg 04 por não ter apresentado boa capacidade germinativa foi inferior aos outros genótipos em todas as avaliações.

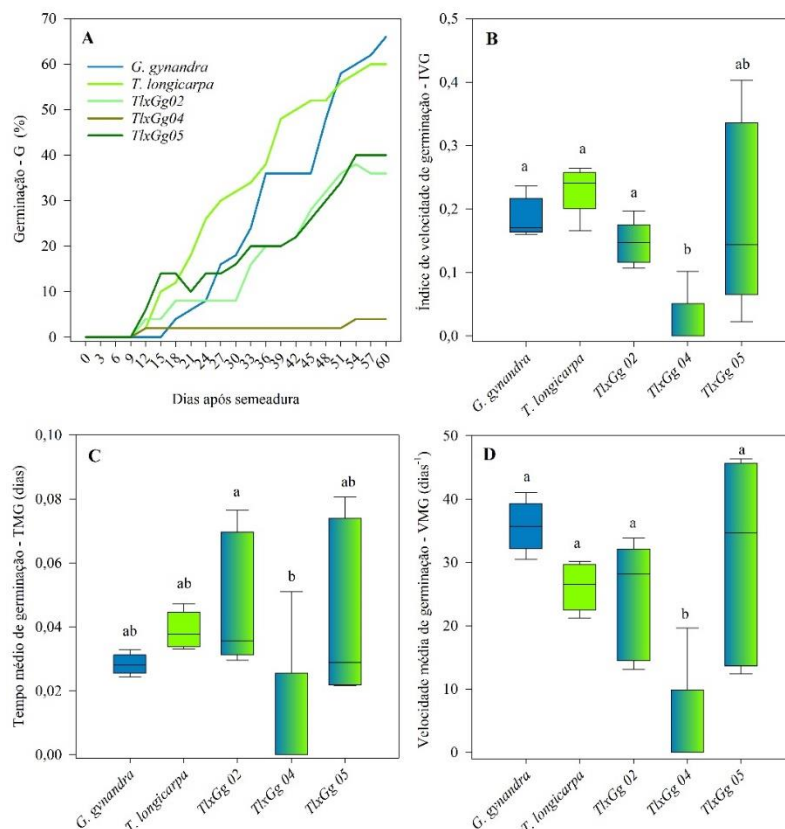


Figura 10. Avaliação dos parâmetros de germinação população F2 das espécies *T. longicarpa* (C₃), *G. gynandra* (C₄) e seus híbridos interespecíficos. Observações foram feitas desde a semeadura até 60 dias após a semeadura.

4. DISCUSSÃO

4.1. Viabilidade de produção de híbridos interespecíficos em Cleomaceae

Neste trabalho, investigou-se a viabilidade da hibridação entre espécies com diferentes mecanismos fotossintéticos da família Cleomaceae, a fim de possibilitar a introdução em espécies C₃ de características relacionadas ao mecanismo concentrador de CO₂ observadas em plantas C₄. Foram utilizadas três espécies, duas com mecanismo C₃, sendo elas *T. hassleriana* e *T. longicarpa* e uma espécie C₄, a *G. gynandra* previamente caracterizadas (Parma et al., *submetido*). Apesar das diferenças no tamanho dos genomas (Parma et al., *submetido*) verificou-se que a combinação de *T. longicarpa* e *G. gynandra* é promissora pois resultou na produção de sementes e, a partir destas, plantas capazes de produzir sementes viáveis. Assim, esses resultados demonstram que híbridos viáveis produzidos de espécies C₃ e C₄ de Cleomaceae podem ser obtidos. No entanto, a viabilidade de sementes e híbridos interespecíficos depende da combinação de parentais e da direção da hibridação.

A maior viabilidade de híbridos resultantes do cruzamento de *G. gynandra* com *T. longicarpa* pode estar relacionado com o fato desta espécie, apesar de ser C₃ ter um genoma maior em relação a outras espécies de Cleomaceae com metabolismo C₃ (Parma et al., *submetido*). Estudos sobre o estabelecimento do mecanismo C₄ em espécies C₃ sugerem que espécies C₃ com maior duplicação de genes são mais aptas a desenvolverem características complexas como as do mecanismo C₄ (Sage, 2021; Parma *et al.*, *submetido*).

Embora a taxa de germinação das linhas híbridas na geração F₂ tenha sido abaixo dos valores obtidos em sementes dos parentais, o potencial reprodutivo foi suficiente para caracterizar as linhas híbridas como férteis (Figura 10). Frequentemente sementes provenientes de plantas híbridas não são capazes de germinar devido a esterilidade por incompatibilidade dos parentais. Muitas vezes essa esterilidade está relacionada a viabilidade dos grãos de pólen, má formação do embrião e anomalias cromossômicas (Colin *et. al.*, 2012; Kathe *et.al.*, 2019). Sendo assim, as linhas híbridas obtidas no presente estudo se mostraram viáveis para estudos genômicos comparativos envolvendo a ampla segregação possível entre seus indivíduos. Porém, para tal, é necessário compreender melhor o comportamento das linhas híbridas através da avaliação de características genéticas como tamanho do genoma nuclear e nível de ploidia nessas plantas.

4.2. Híbridos interespecíficos de *T. longicarpa* e *G. gynandra* apresentam características de anatomia proto-Kranz

A trajetória evolutiva da fotossíntese C₃ para C₄ inclui uma série de etapas adaptativas, envolvendo alterações em características anatômicas e bioquímicas (Sage *et. al.*, 2004; Heckmann *et. al.*, 2016; Sage 2021). Em relação as etapas adaptativas anatômicas, a redução da distância internerval, a densidade de venação e o aumento das células da bainha do feixe vascular nas linhagens híbridas são características que indicam um início de diferenciação celular das mesmas e desenvolvimento de uma anatomia proto-Kranz, que é considerada uma fase inicial no processo de evolução do mecanismo C₄ (Sage, 2004, 2021). Essa anatomia está presente em espécies com fenótipos intermediários de C₃-C₄ e trata-se de uma pré anatomia Kranz, onde existe um pré condicionamento anatômico das células (Sage, 2021). Desse modo, as células da bainha do feixe vascular são maiores em relação as células do mesófilo, observando-se também maior densidade de mitocôndrias e cloroplastos nestas células (Sage, 2021). Essas duas alterações características nas células da bainha do feixe vascular fazem com que haja um aumento na sua atividade fotossintética, tornando-as fotossinteticamente ativas. Entretanto, apesar da maior atividade fotossintética nessas células, ainda não são observadas mudanças na expressão da glicina descarboxilase na anatomia proto-Kranz (Sage, 2014, 2021). Nesse estágio proto-Kranz há também uma tendência de aumento na densidade de veias e redução na distância internerval, o que foi observado nas linhas híbridas em relação a *T. longicarpa*.

O surgimento da anatomia Kranz em plantas durante o estabelecimento do mecanismo C₄ está amplamente ligado a fatores hidráulicos da planta, sendo considerado o mecanismo C₄ inicialmente como uma evolução adaptativa ao estresse hídrico (Colin *et.al.*, 2012; Sage *et.al.*, 2004, 2021). Consequentemente, ao demandar menor transpiração com uma menor condutância estomática resultou no aumento da atividade fotossintética dessas plantas (Sage 2004, Colin *et. al.*, 2012; Sage, 2021). Portanto, características que indicam maiores tolerâncias ao estresse hídrico como aumento na densidade de venação, menores distancias internervais, diferenciação nas células da bainha do feixe vascular e redução da área foliar específica estão diretamente relacionados ao surgimento da anatomia Kranz e início do estabelecimento do mecanismo C₄ (Sage, 2004; Colin *et. al.*, 2012; Zhou *et.al.*, 2018; Sage 2021).

4.3. Alterações no ponto de compensação de CO₂ em híbridos interespecíficos de *T. longicarpa* e *G. gynandra*

Em relação ao ponto de compensação de CO₂ das linhagens híbridas obtidas neste estudo, verificou-se uma redução de aproximadamente 20% em relação a *T. longicarpa* (Figura 5A). Entretanto, essa redução não foi suficiente para igualar os híbridos gerados

à *G. gynandra* em termos de eficiência fotossintética. Isto indica que as propriedades fotossintéticas dos híbridos foram influenciadas pelos dois parentais, exibindo um ponto de compensação de CO₂ intermediário (Patchell *et al.*, 2014; Bayat *et al.*, 2018; Sogbohossou *et al.*, 2019; Parma *et. al.*, *submetido*). As alterações anatômicas promovidas pelos cruzamentos, como o aumento na largura das células da bainha do feixe vascular e redução na distância internerval fazem com que as células da bainha do feixe vascular passem a ter um papel direto na fotossíntese, facilitando a concentração de CO₂ mais próximo a RuBisCO. O que explicaria a redução considerável encontrada nos pontos de compensação de CO₂ em relação a *T. longicarpa*. Porém, para redução do ponto de compensação de CO₂ é necessário a restrição da atividade da glicina descarboxilase as mitocôndrias das células da bainha do feixe vascular. O que só é observado no mecanismo intermediário do tipo C₂ que sucede a anatomia proto-Kranz observada nos híbridos (Sage, 2021). Para este próximo passo na incorporação de mecanismo C₄ são necessários ajustes metabólicos e modificações anatômicas, provavelmente por meio de alterações em regulações transcricionais.

4.4. Híbridos interespecíficos de *T. longicarpa* e *G. gynandra* apresentam parâmetros fisiológicos e metabólicos semelhantes ao de espécies C₃

A taxa fotossintética em condições ambientais das linhagens híbridas foi semelhante à da *T. longicarpa*, variando entre 28 e 31 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 6A). Essa taxa fotossintética é associada a uma condutância estomática (g_s) elevada (Figura 6C). Ou seja, para manter as taxas fotossintéticas observadas nas plantas híbridas, existe a necessidade de uma maior abertura estomática e conseqüentemente menor eficiência no uso da água (WUE) por essas plantas (Figura 6E). Diferente do que ocorre na *G. gynandra*, onde a alta taxa fotossintética (38 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) acompanha uma baixa g_s e baixa transpiração resultando em uma maior WUE nessas plantas (Figura 6E) (Colin *et. al.*, 2012). Além do mais, como as plantas C₄ conseguem realizar fotossíntese mesmo com menor abertura estomática, isso faz com que o processo seja altamente eficiente durante toda a exposição da planta a luz solar, independente de fatores como temperatura e umidade, levando ao aumento nas taxas de fixação de CO₂ por essas plantas (Colin *et. al.*, 2012; Zhou *et.al.*, 2018).

As diferenças metabólicas entre plantas C₃, C₄ e intermediárias C₃-C₄ baseiam-se em diferentes arranjos intercelulares do processo fotorrespiratório, ligados a características anatômicas, bioquímicas e metabólicas (Sage, 2021). Os modelos propostos até o momento sugerem que o estabelecimento do mecanismo C₄ inicialmente se dão as mudanças anatômicas como uma pré-regulação para estabelecimento de um ciclo C₄ inicial (Patchell *et al.*, 2014;

Schuler *et al.*, 2016; Sage, 2021). As características bioquímicas e metabólicas só se alteram após a instalação do mecanismo fotossintético do tipo C₂, quando já ocorreu a restrição da atividade da glicina descarboxilase as mitocôndrias das células da bainha do feixe vascular (Colin *et al.*, 2012; Sage, 2021). A partir daí, se inicia a origem do ciclo C₄ bioquímico, onde começam a haver alterações dos níveis de aspartato, malato e aminoácidos envolvidos no processo fotorrespiratório. Após a instalação inicial do ciclo C₄ bioquímico começam a ocorrer pequenas alterações no metabolismo do nitrogênio e a partir disto é observado um aumento significativo na composição isotópica do carbono, parâmetro utilizado para diferenciação de mecanismos fotossintéticos (Revees *et al.*, 2018; Sage, 2021).

A composição isotópica do carbono das linhagens híbridas foi semelhante a *T. longicarpa* (~-31 ‰), valor típico encontrado em espécies C₃ (Sage, 2021). Assim como a utilização de nitrogênio e relação carbono/nitrogênio (Sage, 2021). Indicando então que não houveram alterações a nível bioquímico no metabolismo do nitrogênio. Reafirmando a instalação apenas de uma anatomia proto-Kranz, ainda sem alterações significativas a nível bioquímico nas linhagens híbridas.

A análise de componentes principais, com base em todas as variáveis analisadas, sugere a separação das linhagens utilizadas em três grupos: (i) *G. gynandra*, (ii) *T. longicarpa* e (iii) linhas híbridas (Figura 10). Os resultados obtidos nessas três linhas híbridas sugerem que, embora os híbridos apresentem alterações anatômicas e no ponto de compensação de CO₂, indicando o possível estabelecimento de uma anatomia proto-Kranz, estas mudanças ainda não são suficientes para alterações significativas na eficiência fotossintética destas plantas. Assim, nossa hipótese é que são necessárias alterações adicionais ao nível de transcrição de genes ou na morfologia destas plantas para que haja de fato o início do estabelecimento de um ciclo C₄ funcional. Assim, torna-se necessário a avaliação do perfil de transcritos que possam estar relacionados as mudanças iniciais aqui descritas, bem como análises de genômica comparativa entre híbridos e parentais.

5. CONCLUSÕES

A hibridação interespecífica em Cleomaceae aparenta ser uma estratégia promissora para avaliar diferenças genéticas entre os mecanismos fotossintéticos e investigação sobre o estabelecimento do mecanismo C₄. Especificamente o cruzamento entre *T. longicarpa* e *G. gynandra* demonstrou potencial para geração de linhas híbridas de grande valor para estudos adicionais.

Os híbridos gerados neste estudo apresentam características de anatomia proto-Kranz, fenótipo comumente descrito como intermediário inicial sem mudanças significantes a nível bioquímico. Apesar de pequenas, as alterações no perfil metabólico em folhas de plantas híbridas permitiram sua diferenciação das espécies parentais. Em conjunto, as alterações anatômicas e metabólicas observadas permitiram uma redução de aproximadamente 20% no ponto de compensação de CO₂.

Por serem férteis as linhas híbridas geradas apresentam grande potencial em gerar populações subsequentes que permitam investigar o comportamento de características segregantes através de tecnologias avançadas de genômica e bioinformática. Entretanto, para confirmar este potencial ainda são necessários estudos e experimentos envolvendo as populações subsequentes obtidas através dessas linhagens híbridas.

Por fim, a hibridação interespecífica em espécies de Cleomaceae com mecanismos fotossintéticos distintos gera uma possibilidade para que se possa finalmente descobrir um conjunto mínimo de genes que seja capaz de introgreir características do mecanismo fotossintético C₄ em uma espécie C₃.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barrett, R. L., Roalson, E. H., Ottewell, K., Byrne, M., Govindwar, S. P., Yadav, S. R., Gholave, A. R. (2017). Resolving generic boundaries in indian-australasian Cleomaceae: circumscription of *Areocleome*, *Arivela*, and *Corynandra* as distinct genera. *Systematic Botany*, **42**(4), 694–708. doi.org/10.1600/036364417X696401.

Bayat, S., M.E. Schranz, E.H. Roalson, and J.C. Hall. 2018. Lessons from Cleomaceae, the Sister of Crucifers. *Trends Plant Sci.* **23**(9): 808–821. doi: 10.1016/j.tplants.2018.06.010.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254.

Brooks, A., e Farquhar, G. D. (1985). Effect of temperature on the CO₂/O₂ specificity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and the rate of respiration in the light. *Planta*, **165**(3), 397–406.

Brown, N. J., Parsley, K., e Hibberd, J. M. (2005). The future of C₄ research – maize, *Flaveria* or *Cleome*? *Trends in Plant Science*, **10**(5), 215–221. doi:10.1016/j.tplants.2005.03.003.

Caemmerer S Von, Ghannoum O, Pengelly JJJ, Cousins AB. 2014. Carbon isotope discrimination as a tool to explore C₄ photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* **65**, 3459–3470.

Camille Bathellier, Guillaume Tcherkez, George H. Lorimer, Graham D. Farquhar. (2018). Rubisco is not really so bad. *Plant Cell Environ.* **2018**;41:705–716. doi:10.1111/pce.13149.

Colin P. Osborne and Lawren Sack. (2012). Evolution of C₄ plants: a new hypothesis for an interaction of CO₂ and water relations mediated by plant hydraulics. *Phil. Trans. R. Soc. B.* **367**, 583–600. doi:10.1098/rstb.2011.0261.

Covshoff, S., and J.M. Hibberd. (2012). Integrating C₄ photosynthesis into C₃ crops to increase yield potential. *Curr. Opin. Biotechnol.* **23**(2): 209–214. doi: 10.1016/j.copbio.2011.12.011.

Cross, J. M., von Korff, M., Altmann, T., Bartzetko, L., Sulpice, R., Gibon, Y., Stitt, M. (2006). Variation of enzyme activities and metabolite levels in 24 *Arabidopsis* accessions growing in carbon-limited conditions. *Plant Physiology*, **142**(4), 1574–1588. doi:10.1104/pp.106.086629.

Ermakova M, Arrivault S, Giuliani R, et al. 2021. Installation of C4 photosynthetic pathway enzymes in rice using a single construct. *Plant Biotechnology Journal* 19, 575–588. doi: 10.1111/pbi.13487.

Fernie, A. R., Aharoni, A., Willmitzer, L., Stitt, M., Tohge, T., Kopka, J., DeLuca, V. (2011). Recommendations for reporting metabolite data. *The Plant Cell*, 23(7), 2477–2482. doi:10.1105/tpc.111.086272.

Fernie, A. R., Roscher, A., Ratcliffe, R. G., e Kruger, N. J. (2001). Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta*, 212(2), 250–263. doi:10.1007/s004250000386

Fernie, A.R., and H. Bauwe. 2020. Wasteful, essential, evolutionary stepping stone? The multiple personalities of the photorespiratory pathway. *Plant J.* 102(4): 666–677. doi: 10.1111/tpj.14669.

Fiehn, O. (2007). “Validated High Quality Automated Metabolome Analysis of Arabidopsis Thaliana Leaf Disks,” in *Concepts in Plant Metabolomics* (Springer Netherlands), 1–18. doi:10.1007/978-1-4020-5608-6_1.

Flora do Brasil. (2019). Flora do Brasil 2020 - Algas, Fungos e Plantas. Retrieved from <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/BemVindoConsultaPublicaConsultar.do?invalidatePageControlCounter=1eidsFilhosAlgas=%5B2%5DeidsFilhosFungos=%5B1%2C11%2C10%5Delingua=egrupo=5egenero=Tarenayaeespecie=hasslerianaautor=enomeVer>.

Furbank RT. 2011. Evolution of the C4 photosynthetic mechanism: are there really three C4 acid decarboxylation types? *Journal of Experimental Botany* 62, 3103–3108. doi:10.1093/jxb/err080

Gowik U, Bra A. 2011. Evolution of C4 photosynthesis in the genus Flaveria: how 916 many and which genes does it take to make C4? *The Plant Cell* 23, 2087–2105.

Hatch, M. D. (1988). C₄ photosynthesis: a unique mechanism of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure, *Biochimica et Biophysica*, 895, 81–106.

Inda, L. A., Torrecilla, Æ. P., Catala, Æ. P., e Ruiz-zapata, T. (2008). Phylogeny of *Cleome* L. and its close relatives *Podandrogyne* Ducke and *Polanisia* Raf. (Cleomoideae, Cleomaceae) based on analysis of nuclear ITS sequences and morphology. *Plant Systematics and Evolution*, 274, 111–126. doi: 10.1007/s00606-008-0026-y.

Iñiguez C, Capó-Bauçà S, Niinemets Ü, Stoll H, Aguiló-Nicolau P, Galmés J. 2020. Evolutionary trends in RuBisCO kinetics and their co-evolution with CO₂ concentrating mechanisms. *The Plant Journal* 101, 897–918. doi.org/10.1111/tpj.14643.

Jordan, D. B., e Ogren, W. L. (1984). The CO₂/O₂ specificity of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Planta*, **161**(4), 308–313. doi: 10.1007/BF00398720.

Kadereit, G., K. Bohley, M. Lauterbach, D.T. Tefarikis, and J.W. Kadereit. 2017. C3–C4 intermediates may be of hybrid origin – a reminder. *New Phytol.* **215**(1): 70–76. doi: 10.1111/nph.14567.

Katche E, Quezada-Martinez D, Katche EI, Vasquez-Teuber P, Mason AS (2019) Interspecific Hybridization for Brassica Crop Improvement. *Crop Breeding, Genetics and Genomics*. doi: 10.20900/cbgg20190007.

Furbank RT and Kelly S. 2021. Finding the C4 sweet spot: cellular compartmentation of carbohydrate metabolism in C4 photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, **290**. doi: 10.1080/07853890.2020.1840620.

Koteyeva, N. K., Voznesenskaya, E. V, Roalson, E. H., e Edwards, G. E. (2011). Diversity in forms of C4 in the genus *Cleome* (Cleomaceae). *Annals of Botany*, 269–283. doi:10.1093/aob/mcq239.

Lin, M.-Y., N. Koppers, A. Denton, U. Schlüter, and A.P.M. Weber. 2021. Whole genome sequencing and assembly data of *Moricandia moricandioides* and *M. arvensis*. *Data Br.* **35**: 106922. doi: 10.1016/j.dib.2021.106922.

Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L., e Fernie, A. R. (2006). Gas chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols*, **1**(1), 387–396. doi:10.1038/nprot.2006.59.

Luciano, R., Neto, S., e Barbosa, M. R. D. V. (2017). *Cleoserrata* (Cleomaceae): Taxonomic considerations and a new species. *Phytotaxa*. doi:10.11646/phytotaxa.324.2.6.

Luciano, R., Neto, S., Thomas, W. W., Regina, M., Barbosa, D. V., Roalson, E. H., Roalson, E. H. (2018). New combinations and taxonomic notes for *Tarenaya* (Cleomaceae). *Acta Botanica Brasilica*, 1–6. <https://doi.org/10.1590/0102-33062017abb0417>.

Lyu, M. A., Gowik, U., Kelly, S., Covshoff, S., Mallmann, J., Westhoff, P., Zhu, X. (2015). RNA-Seq based phylogeny recapitulates previous phylogeny of the genus *Flaveria* (Asteraceae) with some modifications. *BMC Evolutionary Biology*, 1–14. doi: 10.1186/s12862-015-0399-9.

Madore, M., e Grodzinski, B. (1984). Effect of oxygen concentration on c-photoassimilate transport from leaves of *Salvia splendens* L. *Plant Physiology*, **76**(3), 782–786. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16663924>.

Martin F. Hohmann-Marriott and Robert E. Blankenship. (2011). Evolution of Photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **62**:515-548. Doi: 10.1146/ -042110-103811.

Moore, C.E., K. Meacham-Hensold, P. Lemonnier, R.A. Slattery, C. Benjamin, et al. (2021). The effect of increasing temperature on crop photosynthesis: From enzymes to ecosystems. *J. Exp. Bot.* **72**(8): 2822–2844. doi: 10.1093/jxb/erab090.

Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Gibon, Y., Sulpice, R., Lytovchenko, A., Fisahn, J., Fernie, A. R. (2007). Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. *The Plant Journal*, **50**(6), 1093–1106. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03115.x.

O'Brien, T. P., Feder, N., e McCully, M. E. (1964). Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*, **59**(2), 368–373. doi: 10.1007/BF01248568.

Oakley, J.C., S. Sultmanis, C.R. Stinson, T.L. Sage, and R.F. Sage. (2014). Comparative studies of C3 and C4 Atriplex hybrids in the genomics era: Physiological assessments. *J. Exp. Bot.* **65**(13): 3637–3647. doi: 10.1093/jxb/eru106.

Patchell, M. J., Roalson, E. H., e Hall, J. C. (2014). Resolved phylogeny of Cleomaceae based on all three genomes. *Taxon*, **63**(1), 315–328.

Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE. 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *BBA - Bioenergetics* **975**, 384–394.

Roalson, E. H., Hall, J. C., Roalson, E. H., e Hall, J. C. (2017). New Generic Concepts for African Cleomaceae New Generic Concepts for African Cleomaceae. *Systematic Botany*, **42**(4), 925–942. doi10.1600/036364417X696393.

Rodeghiero M, Niinemets Ü, Cescatti A. 2007. Major diffusion leaks of clamp-on leaf cuvettes still unaccounted: How erroneous are the estimates of Farquhar et al. model parameters? *Plant, Cell and Environment* **30**, 1006–1022.

Reeves, G., Singh, P., Rossberg, T. A., Sogbohossou, E. O. D., Schranz, M. E., and Hibberd, J. M. (2018). Natural variation within a species for traits underpinning C 4 photosynthesis. *Plant Physiol.* **177**, 504–512. doi:10.1104/pp.18.00168.

Taiz, I.; Zeiger, E. Plant physiology, 4th ed. Massachusetts: Sinauer associates, 2006. 705p.

Thulin, M., e Roalson, E. H. (2017). Resurrection of the Genus *Rorida* (Cleomaceae), a Distinctive Old World Segregate of *Cleome*. *Systematic Botany*, **42**(3), 569–577. doi: 10.1600/036364417X695989.

Sage, R. F., e Sage, R. F. (2004). The evolution of C₄ photosynthesis, *New phytologist*, **161**, 341–370. doi:10.1046/j.1469-8137.2004.00974.x

Sage, R.F. (2021). Russ Monson and the evolution of C₄ photosynthesis. *Oecologia*. doi: 10.1007/s00442-021-04883-1.

Sharkey, T.D. 2019. Discovery of the canonical Calvin–Benson cycle. *Photosynth. Res.* **140**(2): 235–252. doi:10.1007/s11120-018-0600-2.

Schuler, M. L., Mantegazza, O., e Weber, A. P. M. (2016). Engineering C₄ photosynthesis into C₃ chassis in the synthetic biology age, *The Plant Journal*, 51–65. doi: 10.1111/tpj.13155.

Shi, X., and A. Bloom. 2021. Photorespiration: The futile cycle? *Plants* **10**(5). doi: 10.3390/plants10050908.

Smith, E. W., Tolbert, N. E. e Ku, H. S. (1976). Variables affecting the CO₂ compensation point, *Plant physiology*, **58**(2), 143–146.

Sogbohossou, E.O.D., D. Kortekaas, E.G. Achigan-Dako, P. Maundu, T. Stoilova, et al. (2019). Association between vitamin content, plant morphology and geographical origin in a worldwide collection of the orphan crop *Gynandropsis gynandra* (Cleomaceae). *Planta* **250**(3): 933–947. doi: 10.1007/s00425-019-03142-1.

Ueno, O., S.W. Bang, Y. Wada, A. Kondo, K. Ishihara, et al. 2003. Structural and biochemical dissection of photorespiration in hybrids differing in genome constitution between *Diplotaxis tenuifolia* (C₃-C₄) and radish (C₃). *Plant Physiol.* **132**(3): 1550–1559. doi: 10.1104/pp.103.021329.

Upadhyay, P., N. Agrawal, P.K. Yadav, and R. Patel. 2020. The Evolutionary Path from C₃ to C₄ Photosynthesis: A Review. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **9**(1): 748–762. doi: 10.20546/ijcmas.2020.901.082.

Von Caemmerer, S., Quick, W. P., e Furbank, R. T. (2012). The development of C₄ rice: current progress and future challenges. *Science*, **336**(6089), 1671–1672. <https://doi.org/10.1126/science.1220177>.

Wang, L., Czedik-eysenberg, A., Mertz, R. A., Si, Y., Tohge, T., Nunes-nesi, A., Brutnell, T. P. (2014). Comparative analyses of C₄ and C₃ photosynthesis in developing leaves of maize and rice. *Nature Biotechnology*, **32**(11), 1158–1165. doi: 10.1038/nbt.3019.

Weber, A. P., Bar-Even, A. (2019). Update: Improving the efficiency of photosynthetic carbon reactions. *Plant physiology*, **179**, 803–812.

Wingler, A., Lea, P. J., Quick, W. P., e Leegood, R. C. (2000). Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philosophical Transactions of the Royal*

Society of London. Series B: Biological Sciences, **355**(1402), 1517–1529. doi: 10.1098/rstb.2000.0712.

Yin X, Struik PC, Romero P, Harbinson J, Evers JB, Van Der Putten PEL, Vos J. 2009. Using combined measurements of gas exchange and chlorophyll fluorescence to estimate parameters of a biochemical C3 photosynthesis model: A critical appraisal and a new integrated approach applied to leaves in a wheat (*Triticum aestivum*) canopy. *Plant, Cell and Environment* **32**, 448–464.

Zhou, H., Helliker, B. R., Huber, M., Dicks, A., e Akçay, E. (2018). C4 photosynthesis and climate through the lens of optimality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **115**(47), 12057–12062. doi: 10.1073/pnas.1718988115.

Zsögön, A., Alves Negrini, A. C., Peres, L. E. P., Nguyen, H. T., e Ball, M. C. (2015). A mutation that eliminates bundle sheath extensions reduces leaf hydraulic conductance, stomatal conductance and assimilation rates in tomato (*Solanum lycopersicum*). *New Phytologist*, **205**(2), 618–626. doi: 10.1111/nph.13084.