

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Cultura de tecidos e transformação genética com o gene *Ddm1* no
estudo do silenciamento de elementos de transposição em
cana-de-açúcar**

Eduardo da Cruz Maduro Picelli

**Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestre em Ciências. Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas**

**Piracicaba
2010**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Eduardo da Cruz Maduro Picelli
Engenheiro Agrônomo

Cultura de tecidos e transformação genética com o gene *Ddm1* no estudo do silenciamento de elementos de transposição em cana-de-açúcar

Orientadora:
Prof.^a. Dr.^a. HELAINE CARRER

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Picelli, Eduardo da Cruz Maduro

Cultura de tecidos e transformação genética com o gene *Ddm1* no estudo do silenciamento de elementos de transposição em cana-de-açúcar / Eduardo da Cruz Maduro Picelli. - - Piracicaba, 2010.
140 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.
Bibliografia.

1. Biolística 2. Biologia molecular vegetal 3. Cana-de-açúcar 4. Controle genético 5. Cultura de tecidos vegetais 6. Expressão gênica 7. Peptídeos 8. Plantas transgênicas 9. Variação genética em plantas I. Título

CDD 633.61
P591c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus pais Eduardo e Eliete pela minha formação, pelo amor, carinho e respeito, pelo exemplo e pelo total incentivo e apoio,

Ao meu irmão Enzo pelo carinho, pelo respeito e pela tolerância,

À minha namorada Larissa pelo amor, carinho, incentivo, pelo respeito ao meu trabalho e as minhas decisões e, principalmente, pelo apoio e compreensão,

À todas as pessoas que me apoiaram e se alegraram por mais essa conquista,

Dedico.

“Aos homens isto é impossível,

Mas a Deus todas as coisas são possíveis”

Mateus 19:26

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida e por sempre me abençoar e iluminar meus passos, guiando para mais esta conquista.

À prof^a. Dr^a. Helaine Carrer pela orientação, oportunidade, amizade, compreensão, confiança, pelo respeito e por todas as experiências compartilhadas desde a minha vinda ao laboratório, há seis anos, como aluno de iniciação científica. Sou muito grato a você, Helaine, por todas essas oportunidade proporcionadas.

Ao prof. Dr. Fábio T. S. Nogueira pela co-orientação, conselhos e sugestões, aquisição e empréstimo de reagentes para realização de alguns experimentos, pela confiança depositada, pelos ensinamentos e pela amizade construída.

A MSc. Valentina de Fátima de Martin pelo suporte técnico, pela sua disposição em querer ajudar, pelo esforço em manter o laboratório organizado e pelo carinho e respeito destinado.

À Laudenir Maria Prioli pelos conselhos, sugestões, interesse, vontade em ensinar, por toda experiência compartilhada e pela compreensão, carinho e confiança depositada para realização e finalização desse trabalho. Muito obrigado Lau!

Ao prof. Dr. Eric Lam (RUTGERS) pela oportunidade e pelas ideias e sugestões, que foram fundamentais para a realização desse trabalho.

Aos técnicos de nível superior Antônio Francisco de Campos Amaral e Ênio Thiago de Oliveira por todo o auxílio prestado, pelas sugestões e pelo convívio.

À Maria Solizete G. Silva, secretária do PPG em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, pelo grande auxílio,

Aos integrantes do Centro de Biotecnologia Agrícola, principalmente aos professores Murilo Melo e Daniel Scherer de Moura pela orientação e pelos ensinamentos transmitidos.

Aos grandes amigos Frederico de Almeida Jesus, Evandro Tambarussi, Marcelo Rogalski, Fausto Andres O. Morea (Cabron), Geraldo F. F. e Silva, pelo apoio, pelo agradável convívio, pelo aprendizado compartilhado e pela oportunidade de trabalhar com pessoas como vocês.

À Tatiana Bistaco pelo seu valioso auxílio e pelo cuidado com as minhas “meninas” (plantas transgênicas), principalmente, nas etapas finais do desenvolvimento desse trabalho.

Aos colegas de laboratório Danila Melotto-Passarin, Joice Brigatti, Simoni Guidetti, André Barbosa, Daniel Ramiro, Roberto Camargo, Luiz Rafael, Carina, Ana Carolina, Olegth Rojas, Simone, Martha pelo companheirismo e pelo convívio.

Aos profissionais Alexandre da Silva Conceição e Elaine Cristina Alexandre pelo apoio, confiança e compreensão na conclusão desse trabalho.

À FAPESP pela concessão da bolsa de estudos.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste projeto de pesquisa.

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
LISTA DE ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 Cana-de-açúcar.....	21
2.2 Cultura de tecidos de cana-de-açúcar.....	23
2.2.1 Peptídeos hormonais.....	26
2.3 Transformação genética.....	29
2.3.1 Transformação genética em cana-de-açúcar.....	30
2.4 Elementos de transposição.....	32
2.5 Silenciamento de elementos de transposição.....	35
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1 Material Vegetal.....	39
3.2 Introdução dos explantes <i>in vitro</i>	39
3.3 Indução de calos embriogênicos e regeneração de plantas.....	41
3.3.1 Meio de cultura MS3C e ML1G1.....	41
3.3.2 Teste de regeneração de plantas.....	42
3.3.3 Efeito da água de coco.....	44
3.3.4 Efeito da aplicação exógena do peptídeo hormonal sintético CLV3 na regeneração de plantas.....	45
3.3.5 Efeito da aplicação exógena do peptídeo hormonal PSK- α na regeneração de plantas.....	46
3.3.6 Regeneração de plantas a partir de discos foliares.....	46
3.4 Estudo do gene <i>Ddm1</i> para construção do vetor de transformação genética de cana-de-açúcar.....	47
3.4.1 Análise <i>in silico</i> do gene <i>AtDdm1</i>	47
3.4.2 Análise filogenética da proteína DDM1 na família Poaceae.....	47
3.5 Construção do vetor com o gene <i>Ddm1</i> para transformação genética.....	48

3.5.1 Isolamento do “gene” e Síntese de cDNA por RT-PCR.....	48
3.5.2 Construção do Vetor de Transformação.....	50
3.5.3 Análise do vetor construído com enzimas de restrição.....	53
3.5.4 Sequenciamento do vetor obtido.....	54
3.6 Transformação genética de cana-de-açúcar.....	55
3.6.1 Preparo das partículas e validação da transformação.....	55
3.6.2 Transformação genética por biolística.....	57
3.6.2.1 Calos embriogênicos.....	59
3.6.2.2 Discos foliares.....	60
3.7 Caracterização molecular dos eventos de transformação.....	61
3.7.1 Extração de DNA total e confirmação por PCR.....	61
3.7.2 Confirmação da integração do gene <i>AtDdm1</i> via sequenciamento.....	62
3.7.3 Extração RNA total e síntese de cDNA para RT-PCR.....	63
3.7.4 Normalização e Análise de Expressão do Gene <i>AtDdm1</i>	64
3.8 Análise da atividade dos LTR Retrotransposon em diferentes estágios do desenvolvimento <i>in vitro</i>	65
3.8.1 Extração RNA total e síntese de cDNA para RT-PCR.....	66
3.8.2 Determinação do gene controle e normalização do cDNA.....	67
3.8.3 Análise de expressão dos LTR Retrotransposons TE010, TE028, TE070 e TE053.....	69
3.8.4 A Análise de expressão dos genes <i>SsDdm1</i> e <i>SsMop1</i>	70
3.9 Análise de expressão do TE010 em diferentes tecidos.....	71
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
4.1 Indução de calos embriogênicos e regeneração de plantas da variedade RB835486.....	73
4.1.1 Meios de indução MS3c e ML1G1.....	73
4.1.2 Teste de regeneração de plantas.....	76
4.1.3 Efeito da água de coco.....	78
4.1.4 Efeito da aplicação exógena do peptídeo hormonal sintético CLV3 na regeneração de plantas.....	82

4.1.5 Efeito da aplicação exógena do peptídeo hormonal PSK- α na regeneração de plantas.....	85
4.2 Regeneração de plantas a partir de discos foliares.....	88
4.3 Estudo do gene <i>Ddm1</i> para construção do vetor de transformação genética de cana-de-açúcar.....	91
4.3.1 Análise <i>in silico</i> do gene <i>AtDdm1</i> e da proteína <i>AtDDM1</i>	91
4.3.2 Análise filogenética da proteína DDM1 na família Poaceae.....	92
4.4 Transformação genética de Cana-de-Açúcar.....	95
4.4.1 Confirmação das plantas transgênicas por PCR.....	103
4.4.2 Confirmação da integração do gene <i>AtDdm1</i> via sequenciamento.....	106
4.4.3 Normalização e Análise de Expressão do Gene <i>AtDdm1</i>	107
4.5 Análise da atividade dos LTR Retrotransposon em cana-de-açúcar.....	111
4.5.1 Análise da atividade dos LTR Retrotransposon em diferentes estágios do desenvolvimento <i>in vitro</i>	111
4.5.1.1 Determinação do gene controle e normalização do cDNA.....	112
4.5.1.2 Análise de expressão dos LTR Retrotransposons TE010, TE028, TE070 e TE053.....	113
4.5.1.3 Análise de expressão dos genes <i>SsDdm1</i> , <i>SsMop1</i>	118
4.5.1.4 Análise de expressão do TE010 em diferentes tecidos.....	120
5 CONCLUSÕES.....	123
REFERÊNCIAS.....	125

RESUMO

Cultura de tecidos e transformação genética com o gene *Ddm1* no estudo do silenciamento de elementos de transposição em cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma das principais culturas agroindustriais do Brasil, sendo amplamente cultivada para a produção de açúcar e etanol. Esta cultura se torna a cada dia mais importante no cenário mundial, devido à busca constante por fontes de energia alternativas e mais sustentáveis. Para atender a crescente demanda, é necessária a liberação frequente de novas variedades, mais adaptadas às regiões de cultivo e tolerantes às alterações ambientais. Assim, o estabelecimento da metodologia de transformação genética além de contribuir para o estudo funcional de genes de interesse é uma metodologia alternativa para obtenção de novas variedades. O processo de obtenção de transgênicos é dependente de um eficiente protocolo de regeneração de plantas *in vitro*, que geralmente envolve uma fase de formação de células indiferenciadas (calos). A indução e a manutenção dos calos são favoráveis ao aumento da atividade de elementos de transposição (ETs) os quais são muito frequentes no genoma de cana e podem acarretar variabilidade no genoma vegetal pela alteração dos padrões e funções gênicas devido a essa mobilização, afrontando a fidelidade genética dos cultivares transgênicos obtidos. Baseando-se na importância de reduzir o período de cultura de tecidos e controlar a atividade dos ETs durante o desenvolvimento *in vitro*, o objetivo desse trabalho foi buscar alternativas no controle e na redução do tempo para regeneração de plantas, inclusive com a aplicação de peptídeos hormonais, assim como de transformar geneticamente as variedades RB835089 e RB835486 com o gene *Ddm1* de *Arabidopsis*, visando o silenciamento dos elementos de transposição em cana-de-açúcar. Para isso, foram analisados os meios de cultura MS3c e ML1G1 e o efeito da água de coco na indução e formação de calos como também na regeneração de plantas. Foram testados os meios de regeneração de plantas MSAc, SRM, ML1R3 e ML1R4, obtendo-se em média 5,2 plantas por explante no meio MSAc, que foi superior aos demais meios. Este meio foi utilizado para testar o efeito individual dos peptídeos hormonais CLV3 e PSK- α em calos embriogênicos, os quais apresentaram acréscimo na regeneração de plantas para 9,3 plantas por explantes com doses de 30 μ M de PSK- α . A transformação genética por biolística através da co-transformação dos genes *neo* e *AtDdm1* resultou em 34 plantas transgênicas. O estudo da mobilização dos ETs durante o desenvolvimento *in vitro* foi realizado para quatro retrotransposons. A expressão heteróloga do gene *AtDdm1* em cana-de-açúcar mostrou atuar no controle da expressão do retroelemento TE010. O estudo da mobilização dos retrotransposons e do gene *Ddm1* endógeno de cana (*SsDdm1*) durante o desenvolvimento *in vitro* confirmou que o gene *SsDdm1* foi chave no controle da expressão dos retroelementos. A transformação genética com o gene *AtDdm1* aliada a rápida regeneração de plantas a partir de discos foliares possibilitam condições que minimizam a expressão dos ETs em cana-de-açúcar.

Palavras-chave: Peptídeos hormonais; Plantas transgênicas; Biolística; LTR retrotransposons; Transposição; Regulação epigenética

ABSTRACT

Tissue culture and genetic transformation with the *Ddm1* gene to study silencing of the transposable elements in sugarcane

Sugarcane is one of the major agro-industrial crops of Brazil being widely cultivated for the production of sugar and ethanol. This culture has become increasingly more important on the world stage each day due to the constant search for alternative and sustainable energy sources. In order to meet growing demand, it is necessary to often release new varieties, better adapted to cultivated expansion area and tolerant to environmental changes. Thus, the establishing of genetic transformation methodology beyond of contributing to the functional study of genes of interest and it is an alternative method for obtaining new varieties. The process of obtaining transgenic plants is dependent of an efficient protocol for *in vitro* plant regeneration, which generally involves a phase of undifferentiated cells (callus). The induction and maintenance of callus are favorable to increase the activity of transposable elements (TEs) which are very frequent in the genome of sugarcane and may cause variability in the plant genome by altering patterns and gene functions due to this mobilization, confronting the genetic fidelity of the transgenic cultivars obtained. Based on the importance of reducing the period of tissue culture and control the activity of TEs during *in vitro* development, the objective of this work was to seek alternatives to control and reduce the time for plant regeneration, including the use of peptides hormone, as well as to genetically transform sugarcane varieties RB835089 and RB835486 with the *Ddm1* Arabidopsis gene to silence the transposable elements in cane sugar. For this, we tested the culture media MS3c and ML1G1 and the effect of coconut water in callus induction and growth as well as on plant regeneration. We tested the plant regeneration media MSAC, SRM, ML1R3 and ML1R4, obtaining an average of 5.2 plants per explants using MSAC, superior to other medium tested. It was used to test the individual effect of peptides hormones such as CLV3 and PSK- α in embryogenic callus, which showed an increase in plant regeneration to 9.3 plants per explant with doses of 30 μ M PSK- α . Genetic co-transformation with the *neo* and *AtDdm1* genes by biolistic resulted in 34 transgenic plants. A study of TEs during *in vitro* development was performed for four retrotransposons. Heterologous expression of the *AtDdm1* gene in sugarcane showed to control the expression of the retroelement TE010. The study of mobilization of retrotransposons and the endogenous *Ddm1* gene (*SsDdm1*) during *in vitro* development confirmed that *SsDdm1* was key gene in controlling the expression of retrotransposons. Genetic transformation with the *AtDdm1* gene and the fast regeneration of plants provide positive conditions to minimize the expression of ETs in sugarcane.

Keywords: Hormone peptides; Transgenic plants; Biolistic; LTR retrotransposons; Transposition; Epigenetic regulation

LISTA DE ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

2,4-D	Ácido 2-diclorofeoxiacético
A	Adenina
<i>Act-1</i>	Promotor da actina-1 do arroz
<i>Adh-1</i>	Promotor do gene álcool desidrogenase-1 do milho
AtDdm1	<i>Arabidopsis thaliana Decrease DNA methylation 1</i>
ATPse	Adenosina trifosfatase
BIOEN	Bioenergia
C	Citosina
<i>CaMV35S</i>	Promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor
cDNA	DNA complementar ao RNA mensageiro
CTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
<i>Ddm1</i>	<i>Decrease in DNA Methylation</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EST	<i>Expressed sequence tag</i>
FAPESP	Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo
<i>Forward</i>	Primer direto (senso)
G	Guanina
Kb	Quilobase (=1000pb)
LTR	<i>Long terminal repeat</i>
Milli-Q	Água destilada e deionizada pelo sistema purificador Milli-Q
<i>Mop1</i>	<i>Mediator of paramutation 1</i>
mRNA	RNA mensageiro
NAA	Ácido naftaleno acético
NCBI	National Center of Biotechnology Information
<i>Neo (nptII)</i>	Neomicina fosfotransferase
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
<i>Reverse</i>	Primer reverso (antissenso)
RNA	Ácido ribonucleico

RNAi	RNA de interferência
RT-PCR	Reação de transcrição reversa seguida de reação de PCR
siRNA	<i>Short interfering RNA</i>
SRM	Shoot apical meristem
T	Timina
TAE	Tampão de eletroforese Tris – Acetato - EDTA
<i>uid-A</i>	Beta-glucoronidase
WT	<i>Wild-type</i> (selvagem)
X-gluc	Ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucorônico

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma cultura de grande importância econômica no Brasil e no mundo. A cultura vem sendo cultivada em regiões tropicais e subtropicais em diversos países, sendo o Brasil o seu maior produtor com cerca de 570 milhões de toneladas numa área de aproximadamente 6,7 milhões de hectares (FAO, 2009; FNP, 2010; UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR – ÚNICA, 2010).

O setor sucroalcooleiro brasileiro tem despertado atenção de diversos países, principalmente pelo baixo custo de produção de açúcar e álcool, seus principais produtos. A exportação do álcool combustível, representado principalmente pelo etanol, tem sido cada vez mais expressivo no saldo da balança comercial brasileira. Diversas nações mundiais, que visam reduzir a emissão de poluentes na atmosfera e a dependência de combustíveis fósseis, buscam no álcool uma importante fonte alternativa e renovável de energia.

Apesar da importância do Brasil como produtor mundial de cana-de-açúcar e a expansão crescente para novas fronteiras agrícolas, o melhoramento genético clássico não tem conseguido acompanhar esse crescimento acelerado gerado pelo aumento na demanda de variedades mais produtivas, tolerantes aos problemas fitossanitários e que possuam maior adaptabilidade as regiões de fronteira agrícola, onde se encontram condições edafo-climáticas desfavoráveis.

O programa SUCEST (Brazilian Sugarcane EST Project) da FAPESP surgiu nesse contexto e gerou milhares de ESTs, organizadas em diversos tipos de bibliotecas, originadas de estádios fisiológicos diversos, como meristemas apicais vegetativos e florais e folhas em diversas fases de desenvolvimento, vários tipos radiculares, sementes, caules, células desdiferenciadas (calos), além de tecidos infectados com bactérias simbióticas (VETTORE et al., 2001). Essas informações levaram a criação do recente BIOEN, como forma de analisar os genes identificados pelo SUCEST, possibilitando desvendar mecanismos moleculares e bioquímicos do desenvolvimento da cana-de-açúcar, bem como, encontrar funções gênicas significativas responsáveis pelas características de superioridade varietal e auxiliar no melhoramento genético da cana-de-açúcar.

O melhoramento genético clássico atua como o principal responsável pela produção e incorporação dessas diversas características de interesse agrônomo nas variedades atuais de cana-de-açúcar. No entanto, o aumento da demanda por novos e promissores clones aliado as limitações no progresso do melhoramento genético em virtude, principalmente, das dificuldades genéticas da cultura, promove cada vez mais a ascensão das ferramentas biotecnológicas, como a transformação genética.

A transformação genética é um sistema dependente da regeneração de plantas *in vitro*. Esse processo é geralmente longo e, muitas vezes, permanece por um extenso período na fase de calos, que é o principal alvo na transformação genética de cana. Essas condições são conhecidas como favoráveis para a atividade de elementos de transposição (ETs), cuja presença no genoma de cana é abundante. Em milho, esses valores representam de 50 a 80% do genoma (SANMIGUEL et al., 1996; SANMIGUEL; BENNETZEN, 1998). Em cana, foram identificados 68 elementos de transposição, sendo que 57 deles estavam ativados durante o estágio de calo. Já em outros tecidos em condições normais de crescimento grande parte desses elementos estava inativo (De ARAÚJO et al., 2005).

ETs geralmente tornam-se móveis nessas condições *in vitro* (HIROCHIKA, 1993; TAKEDA et al., 1999; HIROCHIKA et al., 2000), podendo acarretar críticas mudanças no genoma vegetal pela alteração dos padrões e funções gênicas devido a essa mobilização. Por causa do potencial de dramaticamente alterar estruturas e funções gênicas, mecanismos genéticos e processos que minimizem o processo de cultura de tecidos, principalmente evitando ou reduzindo o estágio de calos, podem auxiliar na regulação dos ETs e evitar efeitos deletérios no genoma hospedeiro.

Embora a maioria dos ETs esteja transcricionalmente silenciada, eles estão frequentemente não regulados em mutantes com diminuição da metilação do DNA (LIPPMAN et al., 2003). A proteína DDM1 é uma ATPase que atua no remodelamento da cromatina e está envolvida na manutenção de metilações (VONGS et al., 1993; JEDDELOH et al., 1999). A perda da metilação do DNA nos mutantes *ddm1* está associada com a desregulação transcricional dos ETs. Assim, a proteína DDM1 parece ter função chave no controle de retrotransposição, pois mutantes *ddm1* foram essenciais para ativação e mobilização de retrotransposons silenciados (HIROCHIKA et

al. , 2000; MIURA et al., 2001; SINGER et al., 2001; TSUKAHARA et al., 2009).

Análises de expressão indicaram maior expressão dos LTR retrotransposons TE010, TE070, TE028 e TE053 durante o estágio de calos, enquanto que a partir do início da regeneração (estágios de maior diferenciação celular) a expressão desses retroelementos foi diminuída. Essa regulação mostrou estar relacionada pelo gene *Ddm1*, de acordo com a correlação entre a atividade dos quatro LTR retrotransposons e o gene *SsDdm1* durante o desenvolvimento *in vitro* de cana-de-açúcar.

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo buscar alternativas no controle e na redução do tempo, inclusive pela aplicação dos peptídeos hormonais CLV3 e PSK- α , para regeneração de plantas *in vitro*, assim como de transformar geneticamente as variedades RB835089 e RB835486 com o gene *Ddm1* de *Arabidopsis*, visando o silenciamento de elementos de transposição em cana-de-açúcar.

A expressão heteróloga do transgene *AtDdm1* apontou que esse gene foi importante no silenciamento do LTR retrotransposon TE010. Sendo assim, a transformação genética com o gene *AtDdm1* aliada a rápida regeneração de plantas, principalmente, a partir de discos foliares possibilitaram condições que minimizam a expressão de ETs em cana-de-açúcar e permitem um maior suporte a futuros estudos envolvendo o silenciamento desses elementos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta alógama, pertencente ao gênero *Saccharum*, tribo Andropogonae, família Poacea. Nativa de regiões tropicais, a cana possui seu centro de origem no sudeste asiático, entre a região da Indonésia e da Nova Guiné (MATSUOKA; GARCIA; ARIZONO, 2005).

Existem várias espécies pertencentes ao gênero *Saccharum*: *S. officinarum* ($2n=80$), *S. spontaneum* ($2n=40-128$), *S. robustum* ($2n=60-205$), *S. sinense* ($2n=81-124$), *S. barberi* ($2n=111-120$) e *S. edule* ($2n=60-80$) (DANIELS; ROACH, 1987). As atuais variedades de cana-de-açúcar são altamente poliplóides. Os cultivares modernos são derivados de uma hibridação interespecífica entre a “cana nobre” *S. officinarum* e a selvagem *S. spontaneum*; e contém de 100 a 130 cromossomos, dos quais 15 a 35% proveniente de *S. spontaneum* e o restante provêm de *S. officinarum* (D’HONT, 2005). O alto teor de açúcar é atribuído a “cana nobre”, enquanto que o vigor vegetativo, a resistência a pragas e doenças e a rusticidade na adaptação a diferentes condições edafo-climáticas são características provenientes de *S. spontaneum*.

A importância da cultura da cana-de-açúcar tem raízes antigas na economia brasileira. A cultura da cana-de-açúcar no país possui importância histórica, política, social e econômica. A indústria sucroalcooleira viveu uma das suas melhores fases quando o álcool passou a ser utilizado como combustível automotivo, incentivado pelo Programa Nacional do Álcool (Pró-Álcool), criado em 1975-76. Porém, apesar de todo o sucesso, o programa foi abandonado duas décadas depois.

Novamente, a agroindústria canavieira vem ganhando amplo espaço no território brasileiro e graças à necessidade e a constante busca por novas fontes de energia, o álcool reaparece nacionalmente como importância estratégica no setor energético, sendo a cana-de-açúcar o ‘combustível’ para o funcionamento e desenvolvimento de toda essa agroindústria.

A representatividade que a cultura vem adquirindo, tanto no cenário nacional quanto no internacional, trás inúmeros benefícios para a economia do país, uma vez que gera açúcar, álcool anidro (aditivo da gasolina), álcool hidratado para os mercados

internos e externos, e, além disso, contribui ainda para a produção de alimentos, papel, produtos químicos e energia elétrica (MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). O aumento do número de carros bicompostíveis (tecnologia “flex-fuel”) comercializados desde 2006 foi superior a 185% (UNICA, 2010), o que exemplifica o avanço esperado da cultura e a tendência de expansão para os próximos anos.

O Brasil é o maior produtor mundial de cana, com uma safra no período de 2008/2009 de aproximadamente 570 milhões de toneladas, valor que representa cerca de um terço da produção mundial, sendo a área ocupada cerca de 6,7 milhões de hectares (FAO, 2009; FNP, 2010; UNICA 2010). O país é o maior exportador de açúcar, respondendo sozinho por 45% de todo o produto comercializado no mundo. Já em relação ao etanol, o País divide com os EUA o papel de maior produtor mundial e, juntos, os dois países são responsáveis por 70% de todo o etanol produzido no planeta. No entanto, o produto norte-americano é exclusivamente derivado do milho e voltado para seu mercado interno. Assim, o Brasil é também, no caso do etanol, o maior exportador mundial, respondendo por 54% desse mercado (CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA - CIB, 2009).

A agroindústria do setor canavieiro gera anualmente mais de US\$ 10 bilhões, cerca de 1 milhão de empregos diretos e atua como importante fonte de sequestro de carbono, além de produzir energia renovável (“ambientalmente limpa”) e ser utilizada na cogeração de energia pela queima do bagaço, representando uma importante estratégia nacional no setor energético.

Apesar da importância do Brasil como produtor mundial de cana-de-açúcar, a produção desta cultura tem sido afetada, nos últimos anos principalmente, por inúmeros fatores, dentre os quais, merecem destaque as condições climáticas desfavoráveis enfrentadas pela conquista de novas fronteiras agrícolas, a carência de variedades adaptadas a essas inúmeras condições edafo-climáticas existentes, falta de mudas de qualidade e dos diversos problemas fitossanitários encontrados.

Até o momento, o melhoramento genético tradicional é a principal ferramenta para o desenvolvimento de novas variedades. Porém, os progressos no melhoramento genético através de programas convencionais de cruzamentos são limitados pelas dificuldades genéticas da cultura. Poliploidia, grande tamanho do genoma, presença de

elementos transponíveis e complexas interações ambientais fazem do melhoramento genético convencional uma alternativa que exige grande demanda de recursos (MANICKAVASAGAM et al., 2004).

Associado a isso, o período para lançamento de uma nova variedade que é longo, apresentando de 12 a 15 anos, além das dificuldades enfrentadas nos cruzamentos e na escolha dos “melhores” materiais, já que muitos materiais são perdidos pela dificuldade de seleção destes. Os longos períodos necessários em cada ciclo de seleção para as características de importância agrônômica, aliado à complexidade da cana-de-açúcar e a capacidade de rápida propagação vegetativa, tornaram a cana-de-açúcar uma cultura bastante conveniente para a aplicação de técnicas de transformação genética (FALCO, 1998).

Recentes desenvolvimentos em biologia molecular e transformação genética podem possibilitar a identificação, o isolamento e a transferência desejada de genes específicos e, desta forma, constituem-se de uma importante ferramenta no auxílio do melhoramento tradicional da cana-de-açúcar (BUTTERFIELD et al., 2002).

2.2 Cultura de tecidos de cana-de-açúcar

A regeneração de plantas provenientes de um sistema de cultura de tecidos é pré-requisito para a aplicação de técnicas biotecnológicas no melhoramento genético da cana-de-açúcar, como a transformação genética. O primeiro relato de regeneração de plantas em cultura de tecidos de cana foi apresentado por Heinz e Mee (1969), a partir de calos.

Estudos envolvendo histologia demonstraram que a regeneração de plantas a partir de tecidos de cana pode ocorrer por organogênese (LIU, 1984; MOHATKAR, 1993; BURNER; GRISHAM, 1995; GILL et al., 2006), embriogênese somática (HO; VASIL, 1983; GUIDERDONI; DEMARLY, 1988; LIU, 1993; SNYMAN, 2001; DESAI, 2004, 2006; SNYMAN, 2006; FRANKLIN, 2006) ou por coexistência de ambas as vias morfogênicas (LIU; CHEN, 1974; CHEN et al., 1988; FALCO et al., 1996; LAKSHMANAN et al., 2006). Entretanto, a embriogênese somática é sem dúvida a via de regeneração mais comumente relatada em estudos envolvendo cana-de-açúcar (GUIDERDONI et al., 1995).

Embriogênese somática tem sido reportada para um grande número de variedades de cana (GUIDERDONI et al., 1995), podendo ser obtida diretamente (MANICKAVASAGAM; GANAPATHI, 1998; DESAI et al., 2004, 2006; LAKSHMANAN et al., 2006; SNYMAN et al., 2006) ou indiretamente (HO; VASIL, 1993; FALCO et al., 1996; FALCO, 1998; GALLO-MEAGHER et al., 2000; ELLIOT, 2002; FRANKLIN et al., 2006), a partir de discos foliares.

A produção de calos é obtida, geralmente, depois do cultivo de segmentos de folhas imaturas de plantas de campo (discos foliares), na presença de auxinas como 2,4-D (GALLO-MEAGHER et al., 2000) ou picloran (FITCH; MOORE, 1990). No entanto, o 2,4-D é a auxina mais efetiva para a indução de calos embriogênicos em cana-de-açúcar (HO; VASIL, 1993). Esta afirmação foi confirmada por outros estudos (CHEN et al., 1988; FITCH; MOORE, 1990; LIU, 1993; CHENGALRAYAN; GALLO-MEAGHER, 2001; DESAI et al., 2004; LAKSHMANAN, 2006). Na indução de calos de cana, o 2,4-D é muitas vezes utilizado em conjunto com outros reguladores de crescimento, como por exemplo, as citocininas. Esses biorreguladores estão geralmente relacionados ao aumento da divisão e proliferação celular durante a indução de calos (CALDAS et al., 1998). O balanço hormonal proporcionado entre auxina e citocinina é determinante na proliferação celular e na formação de calos. Atualmente, a água de coco tem sido utilizada em combinação com o 2,4-D, pois devido a sua composição conter citocininas naturais, sua adição equipara-se ao efeito de aplicação de uma citocinina (CALDAS et al., 1998; MELOTTO-PASSARIN, 2009)

Em cana-de-açúcar, existem basicamente dois tipos de calo: os embriogênicos e os não embriogênicos. Esses dois tipos de calo possuem características morfológicas claramente distintas, além da diferença no potencial morfogênico, segundo constatado por Lakshmanan (2006). Falco et al. (1996) caracterizaram os calos embriogênicos em dois tipos: i) nodular e compacto; e ii) friável e translúcido. O calo do tipo não embriogênico foi descrito, por esses autores, como mucilaginoso e opaco. Estas características também foram relatadas por Melotto-Passarin (2009) e Barbosa (2010).

Na indução de calos embriogênicos em variedades brasileiras de cana-de-açúcar, visando a transformação genética, o meio de cultura MS3c se destaca e tem sido utilizado com sucesso por Falco (1998), Melotto-Passarin (2009) e Jesus (2010).

Já em milho, cuja cultura de tecidos compartilha algumas particularidades com a cultura da cana-de-açúcar, o meio de cultura ML1G1, recentemente desenvolvido por Ahmadabadi et al. (2007), mostrou-se altamente viável na indução de calos para regeneração de plantas a partir de folhas jovens, possibilitando um sistema rápido e eficiente na obtenção de plantas transgênicas.

A regeneração de plantas a partir de calos, geralmente, ocorre em meio desprovido de reguladores de crescimentos e na presença de luz (TAYLOR et al., 1992; FALCO et al., 1996, 2000; MELOTTO-PASSARIN, 2009). Entretanto, a regeneração de plantas pode ser potencializada por diferentes hormônios vegetais (CHENGALRAYAN; GALLO-MEAGHER, 2001). Além disso, em virtude da resposta morfogênica ser fortemente influenciada pelo genótipo, é fundamental que adaptações dos protocolos de regeneração sejam realizadas para cada cultivar a ser utilizada (CIDADE et al., 2006). Os meios de regeneração ML1R3 e ML1R4, desenvolvidos por Ahmadabadi et al. (2007) para milho, mostraram-se altamente eficientes na regeneração de calos a partir de folhas jovens objetivando a transformação genética. ML1R3 e ML1R4 possuem em sua composição, respectivamente, os reguladores de crescimento BAP e NAA. Já o meio de regeneração SRM, otimizado por Lakshmanan et al. (2006) para discos foliares de cana, combinou o concentração dos reguladores de crescimento NAA e BAP, proporcionando rápida e eficiente regeneração de plantas.

Calos embriogênicos, formados via embriogênese indireta, tem sido amplamente selecionados como o tecido-alvo na transformação genética de cana, principalmente utilizando o acelerador de micropartículas (BOWER; BIRCH, 1992; BOWER et al., 1996; GALLO-MEAGHER; IRVINE, 1996; FALCO et al., 2000). Apesar do sucesso dos calos embriogênicos na metodologia de transformação empregada nos últimos anos, principalmente pela eficiência e reprodutibilidade conseguida, limitações existentes como intensivo e laborioso processo de formação e manutenção de cultura de calos, o período de tempo necessário até a obtenção das plantas transformadas, a prolongada exposição ao 2,4-D e a resposta morfogênica genótipo dependente (GAMBLEY et al., 1993, 1994; BOWER et al., 1996; ARENCIBIA et al., 1999; SNYMAN et al., 2000, 2001; GROF; CAMPBELL, 2001; VICKERS et al., 2005). Sabe-se que fatores como a fonte do explante, período em cultura e em estágio de calos, número de subculturas,

reguladores de crescimento, genótipo, composição do meio de cultura e nível de ploidia são capazes de induzir variabilidade genética in vitro (SILVAROLLA, 1992; citado por ZUCCHI et al., 2002). Larkin e Scowcroft (1981) além de relatarem alta frequência de variações genéticas na cultura de tecidos de cana nomearam-nas de “variação somaclonal”. Essa variação tem sido frequentemente reportada em cultura de tecidos de cana-de-açúcar (LOURENS MARTIN, 1987; BURNER; GRISHAM, 1995; TAYLOR et al., 1995; HOY et al., 2003). Embora essa variabilidade genética induzida por cultura de tecidos seja, infrequentemente, benéfica, é indesejável para manutenção de germoplasma, propagação comercial e transformação genética (LAKSHMANAN, 2006).

Diante disso, diferentes fontes de explantes e rotas alternativas de regeneração foram buscadas a fim de superar essas limitações (SNYMAN et al., 2000, 2001; GEIJSKES et al., 2003; MACKNAVASAGAM et al., 2004; FRANKLIN et al., 2006; LAKSHMANAN et al., 2006; SNYMAN et al., 2006). A regeneração direta de plantas via embriogênese e/ou organogênese, apresenta-se um estratégia efetiva para evitar ou substancialmente reduzir a variação somaclonal, uma vez que reduz duração da cultura de tecidos e minimiza a formação de calos em cultura (LAKSHMANAN et al., 2006). Além disso, discos foliares utilizados no bombardeamento e regenerados por embriogênese somática para produzir plantas transgênicas (SNYMAN et al., 2000, 2001; GEIJSKES et al., 2003; DESAI et al., 2004; FRANKLIN et al., 2006; LAKSHMANAN et al., 2006; BARBOSA, 2010; JESUS, 2010) tem demonstrado avanços quando comparado ao atual método de transformação a partir de calos. Uma vantagem desta técnica comparada à utilização de calos embriogênicos é a redução no período de cultura de tecidos. Utilizando calos, o processo para obtenção de plantas transgênicas levou de 24 a 36 semanas, enquanto que a partir de discos foliares o período variou de 14 a 22 semanas (SNYMAN et al., 2000, 2001).

2.2.1 Peptídeos hormonais

Duas décadas se passaram e uma grande quantidade de estudos suportou a idéia de que peptídeos hormonais, juntamente com os “hormônios” vegetais (auxinas, giberelinas, citocininas, etileno, ácido abscísico, brassinoesteróides, ácido jasmônico, ácido salicílico), atuam como sinais a longa distância permitindo a comunicação das

células em resposta a mudanças internas ou externas (FIERS et al., 2007) e são responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento das plantas (BOLLER, 2005; MATSUBAYASHI et al., 2006; SAWA et al., 2006).

As proteínas relacionadas à família CLAVATA3/ESR (CLE) são as mais compreendidas dentre os polipeptídeos em plantas, sendo um total de 32 peptídeos conhecidos em *Arabidopsis* (COCK; MCCORMICK, 2001; OLSEN; SKRIVER 2003; SHARMA et al., 2003; KONDO et al., 2006). Vários peptídeos dessa família foram sintetizados e, recentemente, mostraram-se atuar no controle da diferenciação celular de plantas e na proliferação em *Arabidopsis* (SAWA et al., 2006). Alguns destes são estruturalmente relacionados com o peptídeo CLAVATA3 (CLV3), que se mostra geneticamente suprimir a proliferação de células em gemas meristemáticas, tais como meristema apical e radicular (ITO et al., 2006; WILLIAMS et al., 2005), determinando o destino das células nesses meristemas, onde o balanço entre a divisão das células embrionárias (“stem cells”) e a diferenciação das células deve ser mantida para o crescimento vegetal (RYAN et al., 2002).

A manutenção das células embrionárias no meristema apical é basicamente controlado pelos genes *WUSCHEL* (*WUS*) e *CLAVATA* (*CLV3*). O gene *WUS* promove a proliferação das células embriogênicas do meristema e promove a expressão de *CLV3*. Já o peptídeo ligante *CLV3* interage com o complexo receptor *CLV1/CLV2* para restringir a população de células embrionárias no meristema apical (SAM) pela regulação negativa do gene *WUS* (FLETCHER et al., 1999). Assim, um mecanismo de retroalimentação (feedback) entre *CLV3* e *WUS* mantém o número de células meristemáticas iniciais no meristema apical (BRAND et al., 2000; SCHOOT et al., 2000).

Em mutantes *wus*, as células embrionárias não são mantidas e a formação dos primórdios foliares acontece prematuramente órgãos vegetativos (CLARK, 2001; CARLES; FLETCHER, 2003). A superexpressão de *CLV3* mostrou que pode aparentemente promover diferenciação a partir de células iniciais (FIERS et al., 2005).

Primórdios foliares são formados nas regiões que margeiam a região periférica do meristema. As divisões das células embrionárias ocorrem na região central do

meristema (zona central) e são elas responsáveis por manterem a produção de novas células para o contínuo suporte à formação dos primórdios foliares (Müller et al., 2006).

Kinoshiyo et al. (2007) mostraram o efeito da aplicação exógena do dodecapeptídeo CLV3 no desenvolvimento apical e radicular de *Arabidopsis* e arroz. A concentração de 1 μ M do peptídeo CLV3 foi responsável pela redução do meristema apical. Esses resultados foram similares aos que haviam sido relatados por Ito et al. (2006), Kondo et al. (2006), Sawa et al. (2006), Fukuda et al. (2007). Já em arroz, os autores relataram que mesmo doses de até 5 μ M não apresentaram efeito no tamanho do meristema apical e sugeriram que só doses maiores que 5 μ M devam apresentar algum efeito.

Müller et al. (2006) mostraram anatomicamente o efeito do peptídeo CLV3 na região meristemática apical. O acúmulo desse peptídeo restringiu o crescimento do meristema e promove a alocação das células da zona periférica do meristema para os primórdios foliares.

Segundo Matsubayashi et al. (1999), peptídeos de uma outra família apresentaram regular desdiferenciação e rediferenciação celular em cooperação com auxina (NAA) e citocinina (BAP). Matsubayashi e Sakagami (1996) identificaram esses peptídeos sulfatados de cinco aminoácidos e os chamaram de fitosulfoquinas (PSK- α e PSK- β). Células vegetais em cultura secretam esse peptídeo sulfatado em resposta a adição externa de auxina e citocinina, sendo a PSK- α responsável por provocar, em concentrações de nanomolar, a proliferação celular em colaboração com esses hormônios vegetais.

PSK- α também foi descoberto em células em suspensão de arroz e milho, onde estimou a embriogênese somática assim como a proliferação celular (MATSUBAYASHI et al., 1997; KOBAYASHI et al., 1999; HANAI et al., 2000a).

Tem sido mostrado que a PSK- α promove vários estágios do desenvolvimento vegetal, incluindo embriogênese somática (KOBAYASHI et al., 1999; HANAI et al., 2000; IGASAKI et al., 2003) e formação de brotações laterais em calos (YAMAKAWA et al., 1998; YANG et al., 1999).

Recentemente, Ahmadabadi et al. (2007) utilizaram PSK- α , em milho, em experimentos para indução de calos na luz visando a regeneração de plantas a partir de

folhas.. Esses autores obtiveram resultados satisfatórios com o uso de PSK- α , cuja concentração ótima adotada foi de 30nM, a qual favoreceu não só a proliferação celular, mas também a formação de embriões somáticos e a regeneração de plantas.

Há evidências que sugerem que as células vegetais gradualmente perdem o potencial de reiniciar a proliferação e/ou diferenciação durante a maturação celular e que a PSK- α reativa este potencial, o qual é pré-requisito para o estabelecimento da cultura in vitro (MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 2006)

Portanto, a utilização do pentapeptídeo sulfatado PSK- α pode ser importante no processo de cultura de tecidos, podendo potencializar a proliferação celular e aumentar a regeneração de plantas, o que representa um ponto importante no processo de transformação genética de cana-de-açúcar.

2.3 Transformação Genética

A transformação genética de plantas surgiu no final da década de 80, como uma ferramenta atrativa e de alto potencial no auxílio do melhoramento tradicional. Atualmente mostra-se como uma técnica bastante viável (FALCO, 1998).

Existem diversas técnicas de transformação genética de plantas. Essas técnicas de transformação estão basicamente agrupadas em duas categorias: transformação indireta e direta. A transformação indireta é aquela em que o DNA exógeno de interesse é inserido no genoma vegetal pela ação de um vetor biológico, realizado, principalmente, pela transferência do DNA de interesse por bactérias do gênero *Agrobacterium*; enquanto que a transformação direta é baseada em processos físicos e/ou bioquímicos.

A transformação indireta, mediada por bactérias fitopatogênicas de solo do gênero *Agrobacterium*, é a estratégia mais comum para transformar plantas, principalmente, por ser um sistema simples, eficiente e barato. Possui ainda a vantagem de produzir plantas transgênicas com um número limitado de cópias do transgene, já que a inserção é geralmente um evento preciso (DE BLOCK, 1993). Porém, muitas espécies ou cultivares de cereais e gramíneas (monocotiledôneas) apesar dos avanços na técnica e a escolha de estirpes de bactérias mais específicas à

cultura em questão, encontram ainda certas resistências a esse método de transformação.

Dos métodos que utilizam DNA introduzido diretamente no genoma das plantas, apenas dois são de importância prática: a eletroporação e a biolística (ou biobalística).

A transformação por eletroporação consiste na indução temporária de poros nas membranas celulares dos protoplastos, produzidos por um campo elétrico permitindo, assim, a passagem de íons e moléculas, como a molécula de DNA. Entretanto, o isolamento e cultivo de protoplastos é um processo laborioso e permanece difícil, restringindo o da transformação genética de métodos que dependam dessa fase, como, por exemplo, a eletroporação (FALCO, 1998). Esse método é pouco utilizado para monocotiledôneas (BIRCH, 1997).

Já o método da biolística consiste na aceleração de micropartículas que atravessam a parede celular e membrana plasmática, de forma não letal, carregando o DNA para o interior da célula (FERREIRA et al., 2004). São utilizados microprojéteis de ouro ou tungstênio, com diâmetro em torno de 1µm, nos quais são precipitadas as moléculas de DNA. Parte dos projéteis, que carregam as moléculas de DNA, atingem o núcleo da célula vegetal e liberam o esse DNA precipitado que, em baixa frequência e de forma aleatória, é integrado no genoma (KLEIN et al., 1987).

2.2.1 Transformação genética de cana-de-açúcar

O primeiro relato de transformação genética de cana-de-açúcar foi feito por Chen et al. (1987), com a introdução do gene *cat* (cloranfenicol acetil transferase) em protoplastos, através da eletroporação e polietilenoglicol (PEG). Entretanto nenhuma planta foi regenerada.

A transformação genética de cana-de-açúcar foi obtida com sucesso primeiramente em 1992 por Bower e Birch, através da técnica de biobalística. As plantas transformadas obtidas continham o gene *neo* (*nptII*), que codifica para a enzima neomicina fosfotransferase II, a qual confere resistência a antibióticos aminoglicosídeos (canamicina e geneticina). No mesmo ano, Chowdhury e Vasil bombardearam calos embriogênicos de cana-de-açúcar com o gene *bar*, porém, não conseguiram regenerar

nenhuma planta transgênica, provavelmente devido a idade e tipo de calo utilizado nos experimentos de transformação.

Desde então, inúmeras outras pesquisas foram realizadas para desenvolver métodos eficientes de transformação (SMITH et al., 1992; BIRCH, MARETZKI, 1993; GAMBLEY; FORD; SMITH, 1993; GAMBLEY et al., 1994; BIRCH, 1997; ARENCIBIA et al., 1998; ELLIOTT; BRETTELL; GROF, 1998; ENRIQUEZ-OBREGON et al., 1998; MANICKAVASAGAM, 2004).

Diferentes técnicas foram empregadas com relativo sucesso na transformação de cana-de-açúcar, as quais estão representadas pelo bombardeamento de microprojéteis (BOWER; BIRCH, 1992; BOWER et al., 1996; GALLO-MEAGHER; IRVINE 1996; FALCO, 2000; MELOTTO-PASSARIN, 2009; ARVINTH et al., 2010), eletroporação (RATHUS; BIRCH 1992; ARENCIBIA et al., 2000), *Agrobacterium* (ARENCIBIA et al., 1998; ELLIOT et al., 1998; ENRIQUEZ-OBREGON et al., 1998; MANICKAVASAGAM et al., 2004; MELOTTOPASARIN, 2009; ARVINTH et al., 2010; KALUNKE et al., 2010).

Dentre os diferentes métodos de transformação genética, a biolística destaca-se uma técnica bastante viável, sendo considerado o principal método de transformação de cana-de-açúcar (BIRCH, 1997; MOORE, 1999). Um fator importante para o sucesso do método da biolística na transformação de cana é a escolha do tecido alvo e a capacidade desse tecido gerar um sistema eficiente de regenerar plantas (LAKSHMANAN et al., 2006). Grambley et al. (1993) verificaram que a escolha do tecido é um dos fatores fundamentais nesse processo. Além disso, esse método conta com um sistema bem estabelecido de regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos (BOWER; BIRCH, 1992), os quais são ótimos alvos de bombardeamento (FALCO, 1998).

A transformação genética baseou-se, até o momento, essencialmente visando obtenção a características agronômicas de grande interesse comercial, como resistência a herbicidas (CHOWDHURY; VASIL, 1992; GALLO-MEAGHER; IRVINE, 1996; ENRIQUEZ-OBREGON et al., 1998; FALCO et al., 2000; LEIBBRANDT; SNYMAN, 2003; MANICKAVASAGAM et al., 2004), a insetos (ARENCIBIA et al., 1997, 1999; BRAGA et al., 2003; FALCO; SILVA-FILHO, 2003; ARVINTH et al., 2010; KALUNKE et al., 2010), ao vírus do mosaico (INGELBRECHT et al., 1999;

BUTTERFIELD et al., 2002; GILBERT et al., 2005), a bactéria causadora da escaldadura das folhas (ZHANG et al., 1999), tolerante ao estresse hídrico (MOLINARI, 2007), aos estresses bióticos e abióticos (MELOTTO-PASSARIN, 2009) e acúmulo de sacarose (MA et al., 2000; BOTHA et al., 2001)

Entretanto, a tecnologia de transformação oferece também a possibilidade de estudar os milhares de genes de plantas (com funções conhecidas e desconhecidas) que foram identificados pelos programas genômicos conduzidos em todo o mundo nos últimos anos (DONG et al., 2005), principalmente genes amplamente estudados em plantas modelo, como *Arabidopsis* e tabaco (MOLINARI, 2007).

Essa tecnologia no estudo gênico em cana-de-açúcar pode contribuir num gargalo existente no sistema de transformação genética, que é a instabilidade genética da cana durante a cultura de tecidos (ARENCEBIA et al., 1999; ZUCCHI et al., 2002). Essa instabilidade se deve em parte pela mobilização de elementos de transposição durante cultura de tecidos, principalmente no estágio de calos, já que de Araújo et al. (2005) mostraram que dentre 68 elementos transponíveis identificados, 57 estavam expressos em calos, o que afronta a garantia de fidelidade genética dos cultivares transgênicos obtidos (LAKSHMANAN et al., 2006).

Nesse contexto, a transformação genética no estudo de genes envolvidos no silenciamento de elementos de transposição em cana-de-açúcar pode ser um importante passo na busca de informações referentes ao controle desses elementos durante o desenvolvimento *in vitro* da cultura.

2.4 Elementos de Transposição

Elementos de transposição (TEs) são caracterizados como pequenos segmentos de DNA que se movem dentro do genoma e estão presentes desde bactérias até eucariotos (BENNETZEN et al., 2000). Estes elementos compõem grande parte do genoma dos eucariotos e podem corresponder entre 50% a 80% do DNA nuclear em algumas espécies de gramíneas (FESCHOTTE et al., 2002).

A atividade dos TEs e sua inerente habilidade de mudar de lugar no cromossomo foram descritas pela primeira vez em plantas, pela geneticista Barbara McClintock no final da década de 40.

Os ETs são considerados como agentes mutagênicos e suas atividades produzem mudanças nas sequências de genes, assim como rearranjos ao longo do genoma, e estes rearranjos podem alterar a expressão dos padrões gênicos e a função gênica (BENNETZEN et al., 2000).

Em condições normais de desenvolvimentos, geralmente os ETs encontram-se imóveis, entretanto, em condições de estresse, como durante a infecção viral, após ferimentos e em cultura de tecidos, estes elementos genéticos podem se tornar móveis (LARKIN et al., 1981; PESCHKE et al., 1987). Este fenômeno de ativação de ETs pela condição de estresse durante o processo de cultura de tecidos é aparentemente conservado de mono para dicotiledôneas e pode ser fundamental nas células de plantas (HIROCHIKA et al., 1996).

Nos eucariotos, elementos de transposição estão separados em duas classes de acordo com a forma de transposição. Elementos da classe I ou retrotransposons são aqueles em que a transposição é realizada por intermédio de uma molécula de RNA, mecanismo amplamente conhecido como “copia e cola”. Enquanto que os transposons (classe II) são aqueles que se movimentam via DNA, sem intermédio de uma molécula de RNA. Este mecanismo de transposição é também conhecido como “corta e cola”. Os retrotransposon apresentam transposição duplicativa, isto é, o número de cópias do elemento aumenta após a transposição, potencializando a expansão do genoma (SLOTKIN; MARTIENSSEN, 2007).

Os retrotransposons podem ser separados em dois grupos. O primeiro compreende os elementos da classe I que apresentam longas cadeias repetidas (LTR). Elementos autônomos desse grupo, representados pelas famílias *copia/Ty1* e *gypsy/Ty3* codificam uma proteína similar ao capsídeo viral (*gag*) e uma poliproteína (*pol*), que é processada para produzir protease, transcriptase reversa, RNaseH e integrase, as quais estão envolvidas na transposição do elemento. Já os LTR não autônomos, perderam a maioria das sequências codificantes e as proteínas requeridas para mobilização (WITTE et al., 2001). Em relação aos retroelementos sem LTR, estes estão divididos em LINEs (“*Long Interspersed Nuclear Elements*”) e SINEs (“*Short Interspersed Nuclear Elements*”). Os LINEs são elementos autônomos que codificam todos as proteínas para sua transposição, enquanto os SINEs, cujas sequências

possuem poucas centenas de bases, são elementos que necessitam das enzimas de outro elemento completar seu ciclo replicativo (SMYTH, 1993; SCHMIDT, 1999). Devido ao fato dos retrotransposons realizarem a transposição por intermédio de uma molécula de RNA a expressão desses elementos pode ser analisada pelo acúmulo de transcritos.

Os elementos da classe II são caracterizados pelas repetições terminais invertidas (TIR) e por codificarem a enzima transposase (Tpase), cuja atividade é responsável pela excisão e inserção do elemento (FESCHOTTE et al., 2002).

Durante o projeto SUCEST, foram identificados 68 elementos de transposição (ETs) em cana-de-açúcar, os quais foram agrupados em 11 famílias (DE ARAÚJO et al., 2005). Análises do transcriptoma revelaram que transposons, como os da família *Mutator* e retrotransposons, como os da família *Hopscotch* (como *TE010*) são os ETs mais abundantes no genoma de cana. Além disso, essas duas famílias apresentam ETs altamente ativados na cultura de calos (De ARAÚJO et al., 2005).

Calos é a principal fonte de células embriogênicas empregadas na transformação genética de cana-de-açúcar atualmente. Zucchi et al. (2002) observaram que plantas de cana regeneradas *in vitro* a partir de meristemas apresentavam 7% de polimorfismo em relação ao seus clones não introduzidos *in vitro*. Hirochika et al. (1996) mostraram durante a cultura de tecidos de arroz a ativação dos retrotransposons *Tos10* e *Tos17*. O aumento do número de cópias do elemento *Tos17* no genoma após longo período de cultura de tecidos e a inserção do deste na proximidade de genes altamente expressos indicou que a ativação e mobilização do *Tos17* induzidas por cultura de tecidos provocou mutações.

Embora o significado biológico da ativação de retrotransposons por estresses não tenha sido ainda muito bem estabelecida, a atividade indutiva do estresse é consistente com o conceito de “estresse genômico”, proposto por McClintock (1984). Esse “estresse genômico” representa um fenômeno indesejado no processo de seleção de novas variedades, principalmente no que diz respeito à utilização de processos biotecnológicos para regeneração e seleção de plantas geneticamente transformadas. Esses processos são dependentes das condições de cultura de tecidos, que nas quais se sabe, estes elementos encontram-se geralmente ativos (HIROCHIKA, 1993; HIROCHIKA et al., 1996, 2000; GRANDBASTIEN, 1998; De ARAÚJO et al., 2005).

2.5 Silenciamento de elementos de transposição

Elementos de transposição compõem substancial proporção dos genomas vegetais. Em decorrência da potencialidade em gerar mutações pela inserção no genoma (BENNETZEN et al., 2000), os ETs são controlados por uma série de mecanismos, os quais funcionam basicamente em reconhecer esses elementos e silenciá-los (LISCH, 2009). Assim, devido a predisposição em causar danos nos cromossomos, não é surpresa que ETs, em todas as espécies examinadas em detalhe, parecem estar em estado quiescente, seja transcricionalmente como transposicionalmente inativos (ZILBERMAN et al., 2007).

Embora a maioria dos ETs esteja transcricionalmente silenciada, eles estão frequentemente não regulados em mutantes com diminuição da metilação do DNA (LIPPMAN et al., 2003). Essa regulação ocorre basicamente ao nível transcricional, sendo basicamente orientada pelo fator de remodelamento de cromatina *Ddm1* (TSUKAHARA et al., 2009) ou pelo mecanismo conhecido como metilação do DNA direcionado por RNA (RdDM), o qual representa um processo do silenciamento mediado por RNA de interferência, ou RNAi (LISCH, 2009; TEIXEIRA et al., 2009). Já a regulação ao nível pós-transcricional, que também ocorre pelo mecanismo de RNA de interferência, é geralmente mediada pelos pequenos RNAs de interferência (siRNAs) que orientam a degradação dos mRNA-alvos. A diferença entre a regulação transcricional e a pós-transcricional mediadas por RNAi, é que na primeira forma os siRNAs produzidos pela sequência dos ETs orientam a metilação do DNA ou histona (LIPPMAN et al., 2003; MATZKE et al., 2007; SLOTKIN; MARTIENSSEN, 2007; LISCH, 2009), enquanto que na segunda, os siRNAs orientam a clivagem do mRNA alvo (BAULCOMBE, 2004). Em milho, por exemplo, a regulação via RNAi por intermédio dos siRNAs está fortemente relacionada com a expressão do gene *Mop1*, homólogo do gene RNA polimerase 2 dependente de RNA (*RDR2*) de *Arabidopsis*. A função desse gene está relacionada com a síntese dos siRNAs. Portanto, a perda da função em mutante *mop1* resultou na reativação dos ETs transcricionalmente silenciados e uma substancial redução no acúmulo dos pequenos RNAs de interferência (siRNAs) de 24nt, que recrutam componentes do mecanismo de silenciamento por RNA (JIA et al., 2009).

Dentre os mecanismos de silenciamento anteriormente mencionados, a

regulação ao nível transcricional mediada pelo gene *Ddm1* é a mais antiga (VONGS et al., 1993) e mais detalhada no controle dos ETs em plantas. O gene *Ddm1* (*Decrease in DNA methylation*), caracterizado inicialmente em *Arabidopsis*, codifica uma ATPase que atua no remodelamento da cromatina e possui homologia às proteínas da família SW12/SNF-2. (JEDDELOH et al., 1999). Esses autores afirmaram ainda que o gene *Ddm1* é importante para a manutenção da metilação do DNA, pois em mutantes *ddm1*, a perda da função gênica reduziu cerca de 70% da metilação do DNA.

Em *Arabidopsis*, análises de mutações mostraram que as proteínas DDM1 são requeridas para o silenciamento de transposons e retrotransposons, além de também serem requeridas para o fenômeno do silenciamento gênico transcricional (HIROCHIKA et al., 2000; KATO et al., 2004; LIPPMAN et al., 2003; MIURA et al., 2001; SINGER et al., 2005). A perda da metilação do DNA nos mutantes *ddm1* está associada com a desregulação transcricional dos ETs, levando a ativação e mobilização de retrotransposons silenciados (HIROCHIKA et al., 2000, MIURA et al., 2001, SINGER et al., 2001; TSUKAHARA et al., 2009). Adicionalmente, notaram que os transcritos dos ETs são altamente elevados em mutantes *ddm1* (HUANG et al., 2004).

Hirochika e colaboradores (2000) mostraram que em plantas de *Arabidopsis* mutantes para o gene *ddm1*, os LTR retrotransposons *Tto1* e *Tar17* tornavam-se transcionalmente e transposicionalmente ativos. Porém, quando essas plantas mutantes foram cruzadas com plantas normais para o gene *Ddm1* e retomaram a atividade funcional deste gene, os retroelementos foram silenciados, indicando que a função do gene *Ddm1* foi necessária para supressão dos retrotransposons *Tto1* e *Tar17*.

Tsukahara et al. (2009) relataram a mobilização de várias famílias de LTR retrotransposons presentes no genoma de *A. thaliana*, identificados através de técnicas genômicas, em mutantes do gene *ddm1*. Esses pesquisadores detectaram ainda nesses mutantes o aumento do número de cópia de vários retrotransposons da família *gypsy* (*ATGP3*) e da família *copia* (*ATCOPIA13*, *ATCOPIA21*, *ATCOPIA93*).

Embora os mutantes de *ddm1* exibam baixa metilação do DNA genômico, a necessidade desses genes para o silenciamento pode ser distinta para diferentes tipos de elementos transponíveis (LIPPMAN et al., 2003; RANGWALA et al., 2007), indicando

que existem diferentes rotas para supressão de elementos transponíveis em plantas (LIPPMAN et al., 2003).

Portanto, de acordo com os dados genéticos disponíveis, verifica-se que o gene *Ddm1* é chave no silenciamento dos elementos de transposição (HIROCHIKA et al., 2000; TSUKAHARA et al., 2009), indicando que a transformação genética de cana-de-açúcar com o gene *Ddm1* poderia resultar na manutenção do silenciamento dos ETs, principalmente, em condições de cultura de tecidos, sendo de grande valia ao sistema de transformação genética de cana-de-açúcar.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos e as atividades desenvolvidas na presente dissertação foram conduzidos no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas e Genômica, localizado no Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC), pertencentes ao Departamento de Ciências Biológicas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

3.1 Material Vegetal

Para realização deste trabalho, optou-se pela utilização da variedade de cana-de-açúcar RB835089, devido a um compromisso firmado entre o laboratório de Biologia Molecular de Plantas e a Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) antes do início desse projeto e pelo fato desta variedade se destacar pela alta produtividade agrícola e ampla adaptabilidade às condições de cultivo, além de apresentar excelente adequação ao processo de cultura de tecidos e transformação genética. No entanto, a variedade RB835089 deixou de ser uma variedade de interesse comercial devido a sua susceptibilidade à ferrugem e, desta forma, a área de plantio pela UFSCar decresceu. Diante disso, a disponibilidade no fornecimento da mesma ao laboratório ficou comprometida e, sendo assim, selecionou-se a variedade de cana-de-açúcar RB835486, que passou a ser gentilmente cedida pela UFSCar.

A variedade RB835486, caracterizada pela alta produtividade agrícola, riqueza no teor de sacarose e ampla adaptabilidade às condições de cultivo foi então adotada para os experimentos de cultura de tecidos, transformação genética e biologia molecular.

3.2 Introdução dos explantes *in vitro*

Plantas de cana-de-açúcar das variedades RB835486 e RB835089, com idade variando de 8 a 12 meses (Figura 1A), foram utilizadas como fonte de explantes para os experimentos de cultura de tecidos. O ponteiro da cana (Figura 1B), o qual representa a porção apical do colmo, contém a região meristemática apical envolvida por folhas jovens enroladas, que é conhecida por “palmito”. Logo após a coleta dos ponteiros, 2 a 3 folhas mais externas foram removidas e os “palmitos” (Figura 1C), com

aproximadamente 15 cm de comprimento, foram retirados e submetidos a assepsia (Figura 1D). A seguir, eles foram lavados com etanol 70%, por 1 minuto, e transferidos para condições assépticas, onde foram se submetidos a outras duas lavagens com etanol 70%, por mais 1 minuto cada. Em seguida, realizaram-se três enxágues com água destilada autoclavada. Outras 2 folhas externas foram retiradas do “palmito” e as folhas jovens restantes, envolvendo a região meristemática, foram seccionadas transversalmente em discos de aproximadamente 2 mm de espessura e cerca de 1cm de diâmetro (Figura 1E). Estes discos de folhas imaturas serão aqui referidos como discos foliares, seguindo-se a denominação amplamente utilizada na literatura. Os discos foliares foram imersos durante 1 minuto em solução autoclavada de 150mg.L⁻¹ de ácido cítrico antes de serem introduzidos *in vitro* (Figura 1F), no intuito de reduzir a oxidação do tecido foliar (LAKSHMANAN et al., 2006).

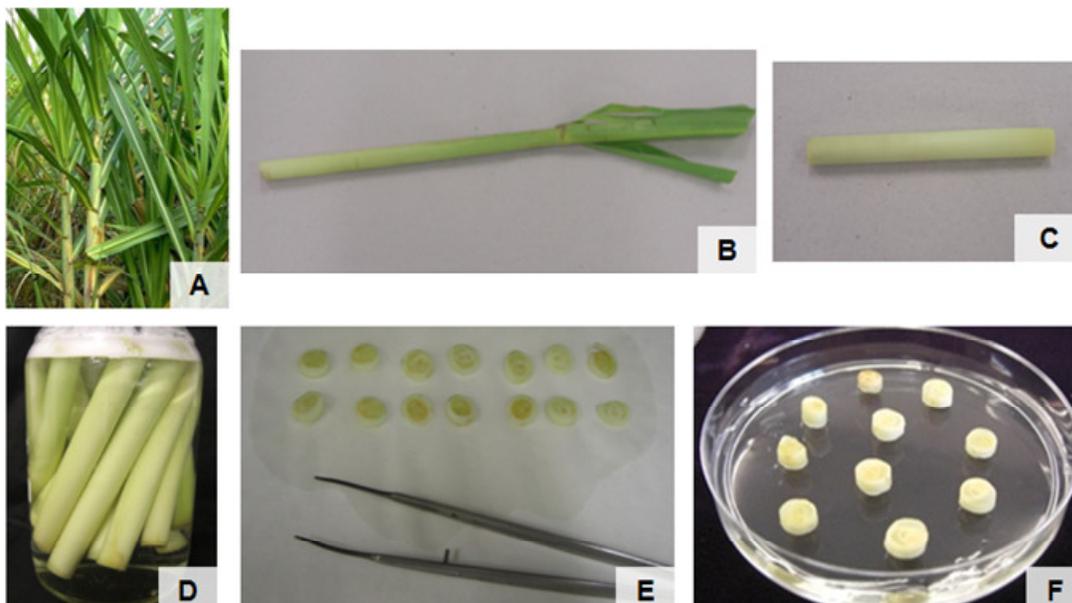


Figura 1 - Metodologia de introdução dos explantes *in vitro*. A: Plantas no campo com 6 a 8 meses. B: Ponteiro. C: Segmento da porção apical que contém a região meristemática apical envolvida por folhas jovens enroladas (“Palmito”). D: Assepsia dos “palmitos” em etanol 70%. E: Seções transversais de aproximadamente 2mm de espessura e 1cm de diâmetro. F: Discos foliares introduzidos *in vitro*

3.3 Indução de calos embriogênicos e regeneração de plantas

3.3.1 Meio de cultura MS3C e ML1G1

Foram utilizados dois diferentes meios de cultura, MS3c e ML1G1, com intuito de comparar estes meios na indução dos calos, qualidade dos calos formados, localização nos discos foliares (setor) em que os calos foram formados, além do efeito dessa indução na regeneração de plantas. Como ilustrado na Figura 2, foram considerados 3 setores nos discos foliares, denominados setores 1, 2 e 3. O meio MS3c tem sido utilizado com sucesso na indução de calos embriogênicos em cana-de-açúcar (FALCO et al., 2000; MELOTTO-PASSARIN, 2009). Já o meio ML1G1, desenvolvido em milho por Ahmadabadi et al. (2007), mostrou-se altamente viável na indução de calos e regeneração de plantas a partir de folhas jovens.

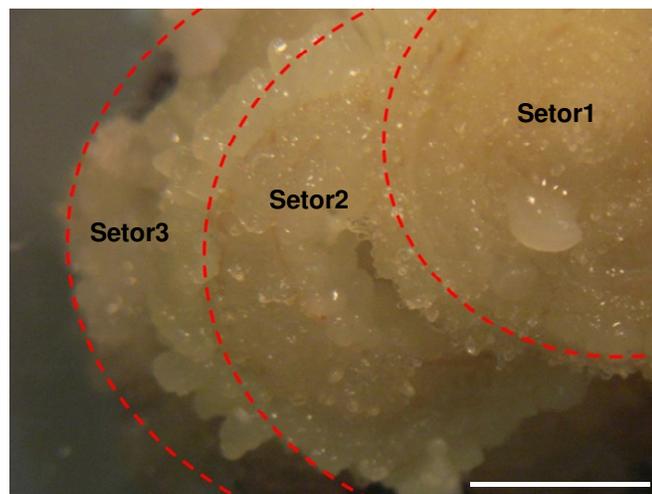


Figura 2 - Ilustração do disco foliar da variedade RB835486 dividido em setores de indução de calos. O setor 1 representa a região central do disco, onde se localizam as folhas mais imaturas. O setor 3 representa a região mais externa do disco, formado pelas folhas mais maduras presentes no disco. O setor 2 representa uma região intermediária aos setores 1 e 3. Barra branca = 2mm

O meio MS3c é constituído pelo meio basal MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com $3,0\text{mg.L}^{-1}$ 2,4-D, 50ml.L^{-1} água de coco (marca Kerococo[®]), 100mg.L^{-1} mio-inositol, 150mg.L^{-1} ácido cítrico, 30g.L^{-1} sacarose e solidificado com $2,3\text{g.L}^{-1}$ de Phytigel[®] (Sigma), após ter seu pH ajustado para 5,8.

O meio ML1G1 é composto pelos sais N₆ (CHU et al., 1975), as vitaminas KT (HORN et al., 1983), suplementado com 2,0mg.L⁻¹ glicina, 100mg.L⁻¹ mio-inositol, 2.880mg.L⁻¹ prolina, 650mg.L⁻¹ cloreto de magnésio, 100 mg.L⁻¹ caseína hidrolizada, 2,2 mg.L⁻¹ 2,4-D, 800 mg.L⁻¹ nitrato de prata, 0,5mM espermidina, 20g.L⁻¹ sacarose, solidificado com 2,3g.L⁻¹ de Phytigel[®] (Sigma). O pH foi ajustado para 5,8. Nitrato de prata e espermidina foram adicionados ao meio de cultura após autoclavagem.

O efeito dos meios de cultura MS3c e ML1G1 na indução de calos embriogênicos foi avaliado em um experimento com delineamento inteiramente casualizado, que consistiu de dois tratamentos (meios MS3c e ML1G1), com 15 repetições por tratamento, sendo cada repetição formada por uma placa contendo 10 discos foliares. As culturas foram incubadas em câmara de ambiente controlado, no escuro, a 27±1°C. Após 30 dias, analisou-se a porcentagem de indução de calos e a localização (setor) no disco em que esses calos se formaram. Os resultados de indução de calos foram analisados estatisticamente segundo o teste de Tukey (P<0,05).

Em sequência, os calos induzidos de cada setor foram separados, transferidos para o mesmo meio fresco, nos quais foram subcultivados a cada 3-4 semanas. Após o quarto subcultivo (estágio denominado R₄), avaliou-se a qualidade dos calos formados em relação as suas características morfológicas e a verificou-se qual região do disco, que associada ao meio de cultura, proporcionou melhor indução de calos embriogênicos.

Em virtude da qualidade dos calos formados em ML1G1, somente calos induzidos no meio MS3c foram utilizados para experimentos de regeneração de plantas.

3.3.2. Teste de regeneração de plantas

Calos embriogênicos no estágio de subcultivo R₄, induzidos em meio MS3c, foram transferidos para quatro distintos meios de regeneração: MSAc, SRM, ML1R3, ML1R4 (Tabela 1), no intuito de verificar qual o meio de regeneração que proporciona maior número de plantas regeneradas por calo (segmentos de aproximadamente 2mm³).

Tabela 1 - Composição dos meios de regeneração utilizados nos experimentos de regeneração de plantas de cana-de-açúcar a partir de calos e discos foliares

	MSAc ⁽¹⁾	SRM ⁽²⁾	ML1R3 ⁽³⁾	ML1R4 ⁽³⁾
Composição básica				
Sais	MS	MS	N ₆	N ₆
Vitaminas	MS	MS	KT	KT
Suplementos				
Glicina (mg.L ⁻¹)	-	-	2	2
Mio-inositol (mg.L ⁻¹)	-	-	100	100
Prolina (mg.L ⁻¹)	-	-	2.880	2.880
MgCl ₂ (mg.L ⁻¹)	-	-	650	650
Caseína hidrolisada (mg.L ⁻¹)	-	-	100	100
Ácido Cítrico (mg.L ⁻¹)	150	150	-	-
Sacarose (g.L ⁻¹)	30	30	20	20
Biorreguladores				
NAA (mg.L ⁻¹)	-	1,86	-	2
BAP (mg.L ⁻¹)	-	0,91	0,5	-
Agente Gelificante				
Phytigel (g.L ⁻¹)	2,3	2,3	2,3	2,3

* O pH de todos os meios de regeneração foram ajustados para 5,8.

⁽¹⁾ Meio de cultura formado pelos sais e vitaminas MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962)

⁽²⁾ Meio de cultura desenvolvido por Lakshmanan et al. (2006)

⁽³⁾ Meio de cultura desenvolvido por Ahmadabadi et al. (2007), formado basicamente pelos sais N6 (CHU et al., 1975) e vitaminas KT (HORN et al., 1983)

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado consistindo de 4 tratamentos (4 meios de cultura) com 8 repetições para cada tratamento, sendo cada repetição formada por um frasco de vidro contendo 8 “unidades de calo”. O experimento foi conduzido sob 16 horas de fotoperíodo (intensidade luminosa de 50µmol.m⁻².s⁻¹), na temperatura de 27±1°C, por um período de 30 dias. Transcorrido esse período, analisou-se para cada tratamento o número médio de brotações

formadas e o número médio de plantas regeneradas por explante responsivo. A comparação entre as médias foi analisada estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

3.3.3 Efeito da água de coco

O objetivo desse teste foi verificar se na variedade RB835486 a água de coco é indispensável para indução eficiente de calos embriogênicos com capacidade de regenerar plantas e também se esta poderia ser substituída por cinetina. A utilização de água de coco em meios de cultura apresenta controversas por não ter sua composição padronizada e mensurada. Foram analisados três meios de cultura (tratamentos) quanto à indução de calos morfogênicos: MS3c (controle), cuja composição foi descrita no item 3.3.1, MS3, constituído do meio MS3c sem água de coco; e MS3k, constituído do meio MS3c, mas a água de coco foi substituída por $0,1 \text{mg.L}^{-1}$ de cinetina. Discos foliares foram introduzidos em cada um dos três meios de cultura, onde foram incubados no escuro, a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, por 30 dias. Os calos induzidos foram subcultivados a cada 3-4 semanas e transferido para meio fresco até o quarto subcultivo (estágio R₄), momento no qual se analisou a porcentagem de indução de calo e a qualidade dos calos formados.

O delineamento experimental adotado para o experimento de indução foi o inteiramente casualizado, consistindo de três tratamentos com 12 repetições para cada tratamento, sendo cada repetição formada por uma placa contendo 15 “unidades de calo” (fragmentos de calo com aproximadamente 2mm^3 , mantidos a cada repique). Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

Em sequência, os calos embriogênicos obtidos de cada meio de indução foram cultivados separadamente em meio de cultura MSAc (Tabela 1), para análise de regeneração. O delineamento experimental adotado para esse experimento foi o inteiramente casualizado consistindo de 8 frascos de meio MSAc para cada um dos três conjuntos de calos embriogênicos diferentemente induzidos, sendo que cada frasco (repetição de cada tratamento) foi formado por 8 “unidades de calo” (fragmentos de calo de aproximadamente 2mm^3). O experimento foi conduzido sob 16 horas de fotoperíodo

(intensidade luminosa de $50\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), na temperatura de $27\pm 1^\circ\text{C}$, por um período de 30 dias.

Durante esse período, analisou-se o número médio de brotações formadas, isto é, a parte aérea regenerada sem o sistema radicular desenvolvido; e o número médio de plantas regeneradas por explante responsivo (parte aérea e sistema radicular desenvolvidos). Os resultados entre os tratamentos foram comparados estatisticamente segundo teste de Tukey, com significância de 5%.

3.3.4 Efeito da aplicação exógena do peptídeo hormonal sintético CLV3 na regeneração de plantas

Para testar o efeito da aplicação do dodecapeptídeo CLV3 (RTVPSGPDPLHH – sintetizado pela GenScript) na regeneração de plantas, calos embriogênicos induzidos até o subcultivo R4 em meio MS3c foram transferidos para o meio de regeneração MSAc (Tabela 1) suplementado com crescentes concentrações do peptídeo hormonal CLV3: 0, 1, 5, 10 e $25\mu\text{M}$. O experimento foi realizado em cada meio com 5 placas, as quais continham 15 calos. Após 15 dias, avaliou-se o número de brotações formadas. Os calos regenerando essas brotações foram transferidos para meio MSAc sem adição do peptídeo CLV3. Transcorreu-se 30 dias e foi avaliado o número de plantas regeneradas.

O experimento analisou o efeito de cinco doses do dodecapeptídeo CLV3 na regeneração de plantas a partir dos calos embriogênicos. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado consistindo de 5 tratamentos com 5 repetições para cada tratamento, sendo cada repetição formada por uma placa de Petri contendo 15 “unidades de calo” (fragmentos de aproximadamente $0,2\text{cm}^3$). O experimento foi conduzido sob 16 horas de fotoperíodo (intensidade luminosa de $50\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), na temperatura de $27\pm 1^\circ\text{C}$, por um período total de 45 dias. Durante o experimento, avaliou-se para cada tratamento o número médio de brotações formadas e o número médio de plantas regeneradas por explante responsivo. As médias dos resultados por tratamento foram comparadas estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

3.3.5 Efeito da aplicação exógena do peptídeo hormonal PSK- α na regeneração de plantas

Com o objetivo de analisar o efeito da aplicação do pentapeptídeo fitosulfoquina alfa, PSK- α (NeoMPS), na regeneração de plantas, calos embriogênicos induzidos até o subcultivo R4 em meio MS3c foram transferidos para o meio de regeneração MSAc (Tabela 1) suplementado com crescentes concentrações do peptídeo hormonal PSK- α : 0, 15, 30 e 45nM.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado consistindo de 4 tratamentos (MSAc com 0, 15, 30 ou 45nM de PSK- α) com 5 repetições para cada tratamento, sendo cada repetição formada por uma placa de Petri contendo 15 “unidades de calo” (fragmentos de aproximadamente 2mm³). O experimento foi conduzido sob 16 horas de fotoperíodo (intensidade luminosa de 50 μ mol.m⁻².s⁻¹), na temperatura de 27 \pm 1°C, por um período total de 30 dias. Durante o experimento, avaliou-se para cada tratamento o número médio de brotações formadas e o número médio de plantas regeneradas por explante responsivo. A comparação entre as médias foi analisada estatisticamente segundo o teste de Tukey (P<0,05).

3.3.6 Regeneração de plantas a partir de discos foliares

Discos de folhas imaturas (discos foliares) ou secções transversais de 1-2 mm de espessura do palmito da variedade RB835089 foram introduzidos nos meios MS3c e ML1G1 (descritos no item 3.3.1) para pré-indução de calos por um período de 15 e 30 dias, no escuro e sob temperatura de 27 \pm 1°C. Os discos diferentemente pré-induzidos (meio de cultura e período de tempo) foram então transferidos para 4 distintos meios de regeneração: MSAc, SRM, ML1R3, ML1R4 (Tabela 1).

Foram analisados 8 tratamentos para cada período de pré-indução (15 e 30 dias) no escuro, sendo que os tratamentos representam a combinação de quatro meios de regeneração (MS, SRM, ML1R3 e ML1R4) com cada um dos meio de indução (MS3c e ML1G1).

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado consistindo de 8 tratamentos para cada período de pré-indução, com 8 repetições para cada tratamento, sendo cada repetição formada por um frasco de vidro contendo 5 discos. A

etapa de regeneração ocorreu por um período de 30 dias na luz, sob 16 horas de fotoperíodo com intensidade luminosa de $50\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e temperatura de $27\pm 1^\circ\text{C}$. Analisou-se para cada tratamento o número médio de brotações formadas por explante responsivo (parte aérea regenerada sem o sistema radicular desenvolvido) e o número médio de plantas regeneradas por explante responsivo (parte aérea e sistema radicular desenvolvidos). A comparação entre as médias foi analisada estatisticamente segundo o teste de Tukey ($P < 0,05$).

3.4 Estudo do gene *Ddm1* para construção do vetor de transformação genética de cana-de-açúcar

3.4.1 Análise *in silico* do gene *AtDdm1*

O gene *Ddm1* de *A. thaliana* (*AtDdm1*) foi analisado *in silico* para sua caracterização molecular, no intuito de gerar informações para identificação de proteínas DDM1 presentes em cana-de-açúcar e em espécies da família Poaceae, a fim de escolher a proteína mais adequada para transformação genética de cana-de-açúcar.

A análise *in silico* foi inicialmente realizada utilizando a homepage “*The Arabidopsis Information Resource*” (TAIR, acesso: <http://www.arabidopsis.com>), que possui um banco de dados com a sequência completa do genoma de *A. thaliana*, para a identificação da sequência completa da proteína e estrutura do gene, assim como a localização no genoma, informações sobre o produto gênico, metabolismo e expressão gênica. Posteriormente, utilizou-se de informações do banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para identificação da sequência proteica e verificação dos domínios conservados existentes.

3.4.2 Análise filogenética da proteína DDM1 na família Poaceae

A sequência da proteína DDM1 e do cDNA de *A. thaliana* (acessos NP_201476.1 e NM_126073.2, respectivamente) foram utilizados como referência na busca de proteínas com sequências similares, em espécies da família Poaceae. Optou-se por utilizar o cDNA, ao invés da proteína *AtDDM1*, para a busca em alguns bancos de dados já que estes não disponibilizavam outra opção para realizar a busca.

A ferramenta utilizada na busca foi o BLAST (BLASTn, tBLASTn, tBLASTx) presente em diversos bancos de dados públicos como NCBI, TIGR, Chrom DataBase (arroz, sorgo e milho), Gramene (arroz, milho, sorgo, cana-de-açúcar), Phytozome (arroz e sorgo) e SUCEST (cana-de-açúcar).

Utilizando a proteína *AtDDM1* como referência (“*query*”), as sequências das proteínas obtidas dos membros da família Poaceae foram alinhadas pelo algoritmo CLUSTAL W (THOMPSON et al., 1994), cujo programa é integrante do software Bioedit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999) (acesso do software pelo website: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Os domínios conservados de cada proteína foram caracterizados, isolados e reagrupados formando uma única sequência para cada proteína. Essas sequências (agora contendo apenas os domínios conservados das proteínas) foram novamente alinhadas e a matriz de alinhamento das regiões conservadas foi importada para o programa MEGA4 versão 4.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis - TAMURA et al., 2007) para análise filogenética.

Analisou-se a matriz de identidade entre as proteínas selecionadas. Essa análise estima a convergência evolutiva entre os domínios conservados das proteínas. Para a construção da árvore filogenética e comparação evolutiva das sequências, foi utilizado o método de inferência “Neighbor-joining”, o qual teve o grau de confiabilidade testado pelo teste de *bootstrap*, cujo valor estabelecido foi equivalente a 1000 (FELSENSTEIN, 1985).

3.5 - Construção do vetor com o gene *Ddm1* para transformação genética

3.5.1 Isolamento do “gene” e Síntese de cDNA por RT-PCR

Em relação aos resultados de filogenia obtidos, pelo fato da sequência do gene *Ddm1* de cana-de-açúcar não estar completa e pela grande quantidade de estudos com a proteína DDM1 de *Arabidopsis* (VONGS et al., 1993; JEDDELOH et al., 1998, 1999; HIROCHIKA et al., 2000; BRZESKI et al., 2003; LIPPMAN et al., 2003; SAZE et al., 2008), optou-se por utilizar a região codificante gene de *Ddm1* de *A. thaliana* para a realização das construções.

Segundo informações obtidas do banco de dados TAIR, o qual representa um banco de dados completo e atualizado para *Arabidopsis*, constatou-se que a expressão do gene *Ddm1* de *Arabidopsis* é relativamente alta nas flores, quando comparada às folhas, frutos, haste floral e raízes. Diante disso, flores de *Arabidopsis*, crescendo em casa de vegetação do Departamento de Genética da ESALQ/USP, foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. O tecido foi macerado em nitrogênio líquido e o RNA total foi extraído pelo método do Trizol *Reagent* (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA total foi quantificado no espectrofotômetro Nanodrop[®] (Thermo Scientific) e analisado em gel de agarose 0.8% (TAE 1x; 5V.cm⁻¹) para certificação de sua integridade. Aproximadamente 5µg de RNA total foram tratados com *Amplification grade DNase I free of RNase* (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante, no intuito de eliminar possíveis contaminações com DNA genômico, o que poderia desfavorecer a amplificação correta do cDNA alvo. O RNA total tratado com DNase I foi utilizado para a síntese do cDNA, por meio do kit *SuperScript First Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen), tendo os oligo(dT) presentes no kit como primers.

Para amplificação cDNA alvo (*AtDdm1*) utilizou-se os primers *forward* (senso): 5' ATA GGA TCC GAT GGT TAG TCT GCG CTC C 3' e *reverse* (antissenso): 5' AGC GGA TCC CTA ACT GTT CAG GGA AGA CAG C 3'. Os primers foram desenhados segundo a sequência completa do cDNA de *Arabidopsis* no GenBank (acesso: NM_126073.2) e, posteriormente, analisados pelo software *VectorNTI* da Invitrogen quanto a temperatura de desnaturação (T_m - "Melting temperature"), a formação de dímeros ("cross" e "self-dimers") e a formação de estruturas secundárias ("hairpins"). Adicionou-se às extremidades 5' dos primers a sequência "GGATCC", referente ao sítio de restrição da enzima *Bam*HI, para clonagem do inserto no vetor de transformação. A reação de PCR foi realizada conforme o seguinte protocolo: desnaturação inicial por 5 minutos a 94°C; 35 ciclos: 30 segundos a 94°C (desnaturação), 30 segundos a 55°C (anelamento dos primers), 3 minutos a 72°C (extensão); extensão final por 7 minutos a 72°C. Nessa reação de PCR utilizou-se a enzima DNA polimerase *Taq Platinum* (Invitrogen), uma vez que essa enzima possui atividade exonuclease 3' → 5' (para

reparação de erros durante a extensão) e permite ampliações com alta fidelidade de até 4.0Kb.

O produto da PCR foi analisado em gel de agarose 0.8% (TAE 1x; 5V.cm⁻¹), conforme mostrado na Figura 3. A banda no gel com tamanho de 2,4Kb, referente ao fragmento amplificado do cDNA do gene *AtDdm1*, foi purificada com o kit *DNA Gel Extraction* (Fermentas), procedendo-se conforme as instruções contidas no kit. O fragmento purificado foi utilizado para a construção do vetor de transformação genética de cana-de-açúcar.

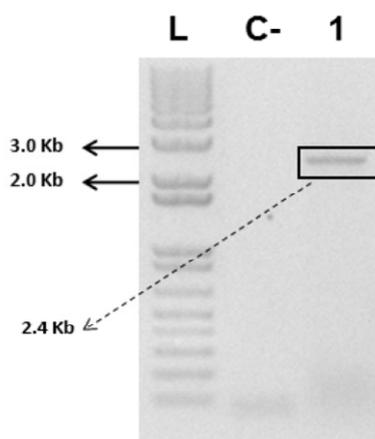


Figura 3 - Fotografia de um gel de agarose 0,8% corado com brometo de Etídio (0,1%), mostrando o produto obtido da amplificação do cDNA floral de *A. thaliana*, referente ao cDNA do gene *AtDdm1*. (L): 1Kb ladder plus (Invitrogen); (C-): Reação de PCR controle. (1): Fragmento referente ao gene *AtDdm1* contendo 2,4Kb

3.5.2 Construção do Vetor de Transformação

Como estratégia inicial para a construção de vetores para a transformação genética de cana-de-açúcar com o cDNA do gene *AtDdm1* (o qual, daqui em diante, passará a ser designado apenas como “gene *AtDdm1*”), baseou-se na transformação genética pelo método da biolística, através da co-transformação com o gene *neo*. Este gene marcador seletivo, presente no vetor pHA9 (Figura 4) confere resistência aos antibióticos aminoglicosídicos canamicina e geneticina, sendo este último o agente seletivo preferencial para monocotiledôneas, como o caso da cana-de-açúcar (BOWER; BIRCH, 1992; FITCH; DE LA CRUZ; MOORE, 1995; FALCO, 2000).

ARVINTH et al., 2010).

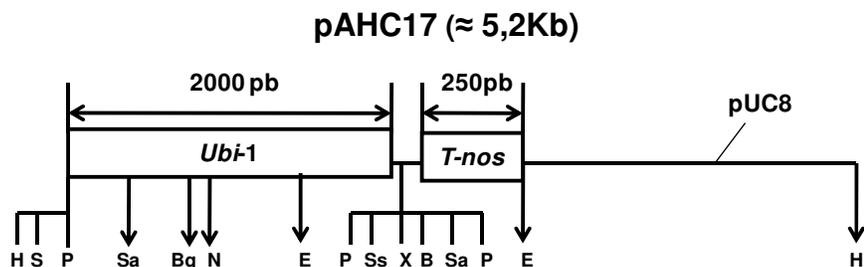


Figura 5 - Esquema representativo do plasmídeo pAHC17 desenvolvido por Christensen et al., 1992. Contém o promotor da ubiquitina do milho (*Ubi-1*), o sítio múltiplo de clonagem e o terminador da nopalina nopalina sintase (*T-nos*). Sítios de restrição: B, *Bam*HI; Bg, *Bgl*II; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; N, *Nhe*I; P, *Pst*I; Sa, *Sal*I; Ss, *Sst*I; Sp, *Sph*I; T, *Tth*I; X, *Xba*I

O fragmento purificado *AtDdm1* foi clonado no plasmídeo pCR[®]4-TOPO[®] (Invitrogen), resultando no plasmídeo pEP8. O vetor pCR[®]4-TOPO[®] (Invitrogen) possui no sítio de clonagem a enzima topoisomerase, cuja atividade permite que a ligação fosfodiéster (ligação covalente) entre o fragmento e o vetor ocorra de forma mais eficiente que a ligação mediada por uma enzima utilizada na reação de ligação, com por exemplo, a enzima ligase,. Em seguida, este plasmídeo (pEP8) foi clivado com a enzima *Bam*HI, para retirar o fragmento contendo o gene *AtDdm1*, e clonado no vetor pAHC17 (CHRISTENSEN et al., 1992) previamente digerido com a mesma enzima (Figura 6). Como resultado, obteve-se o vetor final para a transformação genética de cana-de-açúcar, denominado pEP10, o qual possui aproximadamente 7,6Kb. O plasmídeo pEP10 contém o gene *AtDdm1* dirigido pelo promotor *Ubi-1*, possuindo o *T-nos* como terminador (vetor com cassete de expressão *Ubi-1* :: *AtDdm1* :: *T-nos*, representado pela Figura 6.

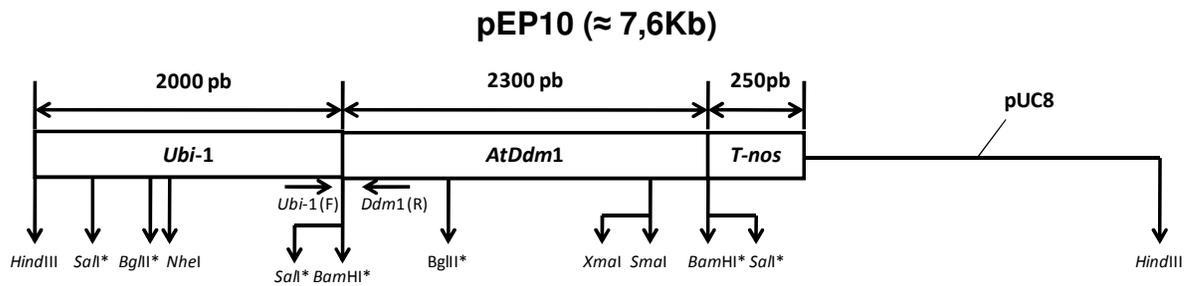


Figura 6 - Esquema representativo do plasmídeo pEP10 com 7,6Kb que contém o cassete de expressão do cDNA do gene *AtDdm1*. Contém o promotor da ubiquitina do milho (*Ubi-1*), o cDNA *AtDdm1* e o terminador da nopalina nopalina sintase (*T-nos*). A posição de anelamento dos primers *Ubi-1* (*Forward*) e *Ddm1* (*Reverse*) está indicada na figura. Os principais sítios de restrição para confirmação do plasmídeo estão posicionados no próprio esquema. *Enzimas de restrição que clivam em mais de uma posição

3.5.3 Análise do vetor construído com enzimas de restrição

Devido a ligação do gene *AtDdm1* ocorrer em apenas num único sítio de clonagem (*Bam*HI) haveria a possibilidade do inserto ligar-se na posição senso (correta) ou antissenso (invertida). Para verificar a integração do inserto e se este de fato estava na posição correta fez-se a digestão dos plasmídeos obtidos (plasmídeo pEP10 obtido de dois clones diferentes) com diferentes enzimas de restrição, conferindo-se os tamanhos dos fragmentos gerados após cada digestão (Figura 7). Utilizou-se o plasmídeo pAHC17 digerido com *Bam*HI e *Sal*I como controle da digestão. Realizou-se digestões específicas para analisar o tamanho dos plasmídeos obtidos, através da linearização do mesmo pela digestão com a enzima *Nhe*I (clivagem única no promotor) e *Sma*I (clivagem única no inserto). Para confirmação da presença do fragmento de aproximadamente 2,4Kb, o qual refere-se ao gene *AtDdm1* clonado, realizou-se a digestão com as enzimas *Bam*HI e *Sal*I. Por último, foi realizado a digestão com a enzima *Bgl*II para checar a posição do gene clonado (sentido senso ou antissenso). Os produtos dessa digestão, para o inserto na posição correta, de acordo com os dois fragmentos esperados, devendo ser de 6,0Kb o fragmento maior e de 1,6Kb o fragmento menor.

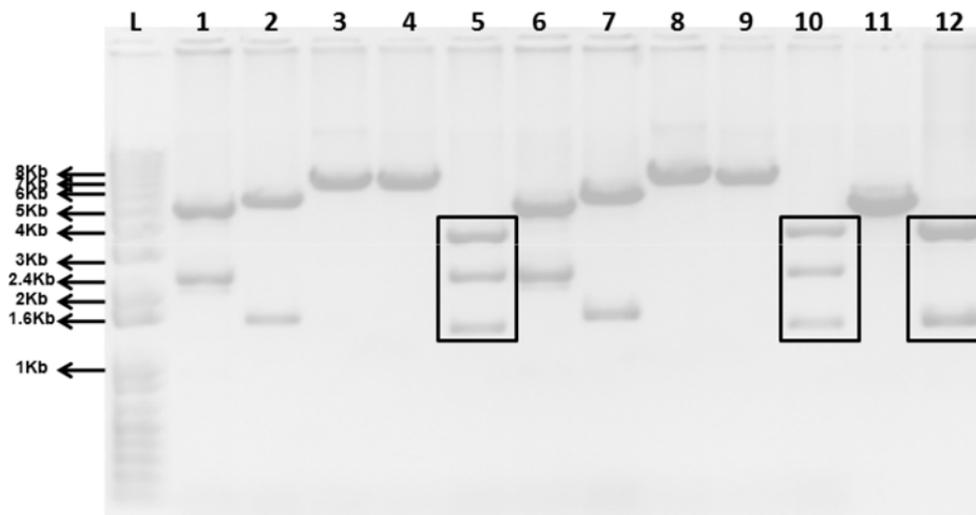


Figura 7 - Fotografia do gel (1,0 % de Agarose) mostrando os vetores dois clones com o plasmídeo pEP10 (clone 1: 1 a 5; clone 2: 6 a 10) após digestão, para verificação da posição do gene *AtDdm1* e confirmação do plasmídeo final para a transformação genética de cana-de-açúcar. (L): 1 kb ladder plus (Invitrogen); (1 a 5): Clone 1 digerido com *Bam*HI (1), *Bgl*II (2), *Nhe*I (3), *Sma*I (4) e *Sal*I (5); (6 a 10): Clone 2 digerido por *Bam*HI (6), *Bgl*II (7), *Nhe*I (8), *Sma*I (9) e *Sal*I (10); (11): pAHC17 digerido com *Bam*HI; (12): pAHC17 digerido com *Sal*I

3.5.4 Sequenciamento do vetor obtido

O sequenciamento do plasmídeo pEP10 foi realizado para confirmação da integridade do gene *AtDdm1* clonado. Para essa técnica, utilizou-se o sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems) com ET *Dye-terminators*, acompanhando os protocolos estabelecidos pelo Laboratório de Biologia Molecular de Plantas e Genômica do Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ/USP.

Seis pares de primers foram confeccionados para o sequenciamento completo do inserto clonado (gene *AtDdm1*), assim como para as regiões que flanqueiam a região codificadora, no intuito de certificar a posição do inserto e verificar a integridade da sequência do gene *AtDdm1*.

Utilizou-se do software *VectorNTI* Suíte 5.0 (Invitrogen) para análise dos cromatogramas gerados pelo sequenciamento. As sequências obtidas foram alinhadas utilizando-se o algoritmo de alinhamento múltiplo CLUSTAL W presente no software *Vector NTI* Suíte 5.0 (Invitrogen), para formação de uma sequência única (*cluster* ou fita consenso). Essa fita consenso foi comparada com as sequências presentes do banco de dados do *GenBank* pela ferramenta BLAST/NCBI (*Basic Local Alignment Search Tool – National Center of Biotechnology Information, USA*) (acesso na homepage

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Confirmou-se a posição do inserto e a sequência correta dos nucleotídeos (100% de identidade) do transgene *AtDdm1* clonado em relação a sequência expressa (cDNA) do gene *Ddm1* de *Arabidopsis* (dados não mostrados). Após ter sido sequenciado, o plasmídeo pEP10 foi utilizado nos experimentos de transformação genética de cana-de-açúcar.

3.6 Transformação genética de cana-de-açúcar

3.6.1 Preparo das partículas e validação da transformação

O preparo de partículas e precipitação dos DNAs de interesse para bombardeamento foi baseado no método descrito por Sanford et al. (1987) e procedeu-se da seguinte maneira:

Inicialmente, realizou-se a assepsia das partículas. Foram pesados 25mg de partículas de Tungstênio M10 (GTE Sylvania Chemicals/Metals) para a lavagem em 500µL de etanol absoluto gelado em um microtubo de 1,5ml. O microtubo, contendo as partículas, foi colocado em agitador tipo vortex por 6 minutos e incubado em banho Maria à 95°C por 1 hora. Centrifugou-se a 10000rpm por 2 segundos e a fase aquosa foi removida cuidadosamente. Adicionou-se 500µL de etanol absoluto gelado e as partículas passaram por um processo de sonicação para desagregação. O sonicador, ou aparelho de ultra-som (*Sonics Vibra Cell*) permaneceu ligado por 15 minutos com os seguintes parâmetros de operação: amplitude 75%, pulsos de 3 segundos ligado e 1 segundo desligado e temperatura ajustada para 20°C. Centrifugou-se a 10000rpm por 2 segundos e a solução sobrenadante foi removida. O precipitado foi lavado com 500µL de água MilliQ autoclavada e centrifugou-se por 10000rpm por 2 segundos. Repetiu-se o procedimento por mais 2 vezes. Ressuspendeu-se as partículas em 500µL de água Milli-Q estéril.

Para a precipitação do DNA de interesse nas partículas de tungstênio, utilizaram-se para seis disparos os componentes de acordo com a seguinte ordem: 50µL de suspensão das partículas de tungstênio, 10µg de DNA de interesse (sendo que para co-transformação foram utilizados 5µg de cada plasmídeo), 50µL da solução 2,5M de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20µL da solução 0,1M de espermidina (Sigma). Após a adição de cada

componente, agitou-se suavemente para homogeneização. Esta suspensão foi incubada a sob agitação de 300rpm por 40 minutos a 4°C. Adicionou-se 200µL de etanol absoluto gelado, agitou-se e centrifugou-se a 12000rpm por 1 segundo. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente e descartado. Novamente, 200µL de etanol absoluto foi adicionado e a lavagem e centrifugação se procedeu por mais 3 vezes. O precipitado foi ressuspendido com 30µL de etanol absoluto gelado. Alíquotas de 5µL da suspensão de partículas envolvidas por DNA foram depositadas em cada membrana carreadora para realização dos disparos.

O bombardeador ou acelerador de micropartículas utilizado nos disparos para transformação genética foi o modelo PDS-1000/He *Biolistic[®] Delivery System* (BIO-RAD). Todo material de consumo utilizado nos experimentos de biolística, como membranas de ruptura (1100psi) e de retenção, telas de retenção e suporte das membranas carreadoras (BIO-RAD) foram imersos em etanol absoluto por 5 minutos, secos em papel de filtro autoclavado e mantidos em fluxo laminar para uso em condições assépticas.

No intuito de verificar se o preparo de partículas foi adequado (DNA precipitado de forma correta nas partículas e estas sem a formação de agregados) e se o bombardeador estava em correta operação, folhas de tabaco foram bombardeadas com o plasmídeo pFF19G (Figura 8), o qual possui o gene *uid-A* (GUS) sob controle do promotor 35S. A análise de expressão do gene GUS para validação do processo de transformação foi analisada histoquimicamente seguindo o método descrito por Jefferson, Kavanagh e Bevan (1987) que consiste em colocar o material bombardeado em contato com o tampão contendo X-gluc e incubar a 37°C por 20 horas.

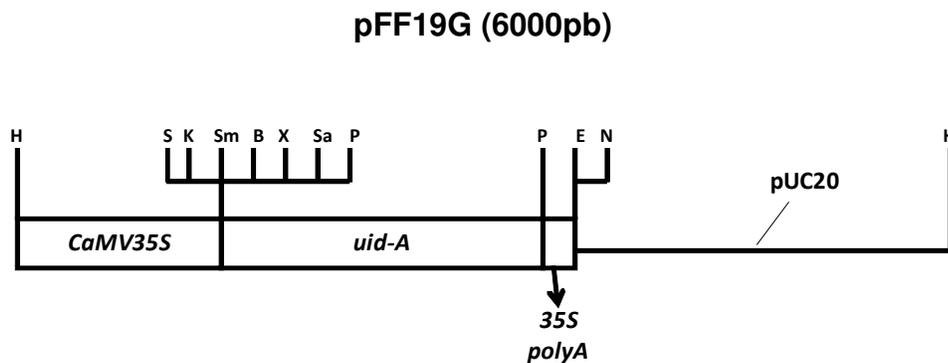


Figura 8 - Esquema representativo do plasmídeo pFF19G com 6000pb que contém o cassete de expressão do gene repórter *uid-A* (GUS), sendo dirigido pelo promotor *CaMV35S* e controlado pelo terminador *35S polyA*. Sítios de restrição B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; N, *Nhe*I; K, *Kpn*I; N, *Nco*I; P, *Pst*I; S, *Sac*I; Sa, *Sal*I; Ss, *Sst*I, Sm, *Sma*I; X, *Xba*I

A visualização ocorre pelo aparecimento da coloração azul (pontos azuis) nas regiões em que expressam a proteína GUS, ou seja, onde ocorre a metabolização do X-gluc pela proteína GUS levando a formação de um substrato de coloração azul. Os pontos azuis observados foram analisados em estereomicroscópio quanto à distribuição e quantidade de pontos, sendo que cada ponto azul, independente do tamanho ou intensidade, foi enumerado como um ponto de inserção do DNA plasmidial e expressão transiente do gene *uid-A* (Figura 9).

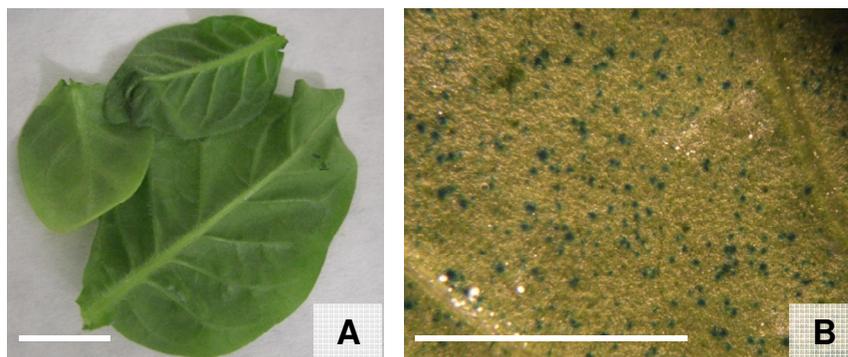


Figura 9 - (A) Detalhe da folha de tabaco (*Nicotiana tabacum*) com a face abaxial voltada para cima para bombardeamento com o plasmídeo pFF19G; (B) Pontos azuis visualizados 48 horas após o bombardeamento, resultado da expressão transiente do gene *uid-A* (GUS) nas células da folha de tabaco em contato com o tampão X-gluc. Barra = 1cm

3.6.2 Transformação genética por biolística

Baseando-se nas tecnologias de transformação genética existentes para monocotiledôneas, como a cana-de-açúcar, a principal metodologia utilizada é a biolística (BOWER; BIRCH, 1992; BOWER et al., 1996; GALLO-MEAGHER; IRVINE,

1996; FALCO, 2000; GILBERT et al., 2005; XU et al., 2008; MELOTTO-PASSARIN, 2009, ARVINTH et al., 2010). No entanto, alguns trabalhos também adotaram a transformação via *Agrobacterium* (ARENCIBIA et al., 1998; ENRIQUEZ-OBREGON et al., 1998; MANICKAVASAGAM et al., 2004; ZHANGSUN et al., 2007; MELOTTO-PASSARIN et al., 2009; PRIYA et al., 2010; ARVINTH et al., 2010). Altpeter et al. (2005) elucidaram que ambos os métodos de transformação possuem características particulares que podem apresentar vantagens ou desvantagens a sua utilização e que a viabilidade e eficiência de transformação estão fortemente relacionadas com a espécie empregada.

Nesse trabalho com cana-de-açúcar, realizou-se a transformação genética pelo método da biolística por ser a principal metodologia utilizada e estar sendo realizada com sucesso para cana-de-açúcar, além de ter sido previamente estabelecida em nosso laboratório. Esse método de transformação foi empregado na co-transformação de calos embriogênicos e discos foliares, das variedades RB835486 e RB835089, com os plasmídeos pHA9 e pEP10, contendo os genes *neo* e *AtDdm1*, respectivamente.

O protocolo para transformação pelo método da co-transformação com o plasmídeo pHA9 (Figura 8) foi estabelecido com sucesso para o gene *neo* por Falco (1998) e, recentemente, adotado por Melotto-Passarin (2009). Segundo Falco (1998), a melhor opção para a seleção de células de plantas monocotiledôneas transformadas com o gene *neo* (*nptII*) é o antibiótico geneticina, uma vez que não interfere no processo de regeneração e pode ser utilizado para a seleção em estágios iniciais. Além disso, o antibiótico canamicina, mostra-se pouco eficaz na seleção em gramíneas, quando comparado em espécies dicotiledôneas.

Testes preliminares confirmaram os resultados de Falco (1998) referente à dose de 30 mg.L⁻¹ de geneticina a ser aplicada para seleção das duas variedades em estudo. No entanto, Birch et al. (1996) indicaram que apenas na primeira semana após o bombardeamento uma dose inferior de 20mg.L⁻¹ de geneticina não seria tão agressiva quanto a dose de 30mg.L⁻¹ desde o início, permitindo que a seleção continuasse de forma eficaz (reduzida a presença de escapes), proporcionando uma quantidade significativamente maior de plantas regeneradas. A metodologia proposta por Birch et al. (1996) foi testada e passou a ser adotada em função dos resultados obtidos.

O procedimento de co-transformação, seleção e regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos e discos foliares estão discutidos em detalhes abaixo.

3.6.2.1 Calos embriogênicos

Calos embriogênicos das variedades RB835486 e RB835089 foram induzidos em meio MS3c. Calos embriogênicos de aspecto nodular, compacto e calos altamente friáveis foram selecionados e transferidos para meio osmótico, por onde permaneceram por 8 horas, sendo quatro horas antes do bombardeamento e mais quatro horas após a realização dos disparos. O meio osmótico consiste do meio MS3c suplementado com 0,4M de manitol e 0,4M de sorbitol. O tratamento osmótico realizado com manitol e sorbitol (alcoóis hexahídricos frequentemente empregados como agente que elevam a pressão osmótica do meio de cultura) tem o efeito fundamental na prevenção de rupturas e vazamento do conteúdo celular, em decorrência da agressão física das células pelo bombardeamento, assim como facilitar a penetração das partículas (FALCO et al., 2000). Danos como necroses (TEE; MAZIAH, 2005), ausência de proliferação celular e formação de novos embriões somáticos (TADESSE et al., 2003) são alguns dos efeitos encontrados após o bombardeamento em calos que não sofreram o tratamento osmótico.

A massa de calos contida em cada placa bombardeada foi de aproximadamente 1,8g, o que equivale a um número médio de 65 “unidades de calo” (fragmentos de calo com aproximadamente 2mm³, separados após os disparos).

Transcorrido o período de 4 horas após os disparos, os calos foram transferidos do meio osmótico para o meio MS3c suplementado com 250mg.L⁻¹ do antibiótico cefotaxima, o qual é indicado por Birch et al. (1997) como um redutor de contaminantes bacterianos logo após os disparos. Os calos permaneceram nesse meio de cultura por 3 dias no escuro (período necessário para que os calos bombardeados recuperem-se do estresse induzido pelo meio osmótico e pelo bombardeamento) antes de serem transferidos para o meio MS3c com 250mg.L⁻¹ de cefotaxima suplementado 20mg.L⁻¹ de geneticina, na primeira semana, e suplementado com 30mg.L⁻¹ nas 3 semanas posteriores, para seleção e proliferação das células transformadas. Os calos foram

mantidos no escuro, sob a temperatura de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$, durante essas 4 semanas de seleção inicial.

Para regeneração, os calos foram transferidos para o meio de regeneração MSAc suplementado com 250mg.L^{-1} de cefotaxima e 30mg.L^{-1} de geneticina, sob 16 horas de fotoperíodo (intensidade luminosa de $50\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e temperatura de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$. Plantas regeneradas foram transferidas a cada 3-4 semanas para meio seletivo fresco, sendo que as plantas já enraizadas foram individualizadas e mantidas em meio seletivo até a obtenção dos resultados moleculares.

3.6.2.2 Discos foliares

Secções transversais de folhas imaturas, também denominadas “discos de palmito”, também foram utilizadas como tecido-alvo no processo de transformação. Lakshmanan et al. (2006) mostraram regeneração de plantas utilizando-se “discos” como explantes.

Discos de palmitos das variedades RB835486 e RB835089 foram introduzidos em meio MS3c, para pré-indução de calos por um período de 15 dias. Discos pré-induzidos, apresentando calos com aspecto morfogênico, foram selecionados e transferidos para o meio MS3c suplementado com 250mg.L^{-1} do antibiótico cefotaxima para efetuação dos disparos. O tratamento osmótico não foi realizado em discos em virtude da elevada oxidação causada aos explantes, o que dificulta o processo de regeneração. A massa de discos contida em cada placa bombardeada foi de 10g, equivalente a um número médio de 11 discos bombardeados por placa.

Os discos bombardeados permaneceram no meio MS3c suplementado com 250mg.L^{-1} de cefotaxima por 3 dias no escuro (para se recuperem do dano mecânico proporcionado pelo bombardeamento), antes de serem transferidos para o meio de regeneração.

Plantas da variedade RB835089 foram regeneradas em meio SRM (LAKSHMANAN et al., 2006) acrescido de 150mg.L^{-1} de ácido cítrico e solidificado com $2,3\text{g.L}^{-1}$ de Phytigel[®] (Sigma), além de 250mg.L^{-1} do antibiótico cefotaxima e 20mg.L^{-1} de geneticina, sendo estes dois últimos adicionados após a autoclavagem. Para a variedade RB835486 adotou-se o meio MSAc acrescido de $0,5\text{mg.L}^{-1}$ BAP, 150mg.L^{-1}

ácido cítrico e solidificado com $2,3\text{g.L}^{-1}$ de Phytigel[®] (Sigma), além de 250mg.L^{-1} do antibiótico cefotaxima e 20mg.L^{-1} de geneticina, sendo estes dois últimos adicionados após a autoclavagem.

Os discos permaneceram em seus respectivos meios de regeneração por uma semana, a $27\pm 1^\circ\text{C}$, sob fotoperíodo de 16h (intensidade luminosa de $50\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), antes de serem transferidos para novo meio de regeneração, porém agora acrescidos de 30mg.L^{-1} de geneticina. Os discos foram mantidos nesse novo meio por 3 semanas, sob a temperatura de $27\pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16h (intensidade luminosa de $50\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). As culturas foram transferidas para meio fresco a cada 4 semanas. Durante a seleção, as brotações regeneradas foram transferidas para o meio MSAc, suplementado com 250mg.L^{-1} de cefotaxima e 30mg.L^{-1} de geneticina, para enraizamento. Plantas enraizadas foram individualizadas e transferidas, a cada 4 semanas para novo meio seletivo, até a obtenção dos resultados moleculares.

3.7 Caracterização molecular dos eventos de transformação

3.7.1 Extração de DNA total e confirmação por PCR

Folhas de 111 plântulas de cana-de-açúcar regeneradas em meio de cultura contendo 30mg.L^{-1} geneticina foram coletadas, maceradas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C para extração de DNA total. O método de extração utilizado foi baseado no método CTAB desenvolvido por Doyle e Doyle (1990). Após a extração, avaliou-se a qualidade e a concentração do DNA obtido em gel de Agarose 1,0% (TAE 1X, 5V.cm^{-1}).

Cerca de 50ng de DNA foi utilizado nas reações de PCR (reação em cadeia da polimerase) para confirmação da inserção no genoma dos cassetes contendo os genes *neo* e *Ddm1*.

A reação de PCR para detecção do transgene com o gene *neo* foi realizada conforme o protocolo: desnaturação inicial a 94°C por 5min; 35 ciclos: 1 minuto a 94°C para desnaturação, 45 segundos a 60°C para anelamento dos primers e 40 segundos a 72°C para extensão; extensão final a 72°C por 10 minutos. Os primers amplificarem um produto de 437pb, pelo anelamento do primer *Forward* (senso) na região terminal do

promotor *Ubi-1* (íntron) e do primer *Reverse* (antissenso) na sequência do gene *neo*. Essa disposição dos primers no transgene do plasmídeo pHA9 (Figura 8) garantiu que o gene *neo* amplificado tenha sido originado do transgene inserido no genoma. A sequência desses primers utilizados para a amplificação foi: *Forward* (senso) – 5` CTG TGC TCG ACG TTG TCA CT 3` e *Reverse* (antissenso) – 5` AGC CAA CGC TAT GTC CTG AT 3`.

A reação de PCR para confirmação da presença do gene *Ddm1* foi realizada conforme o protocolo a seguir: desnaturação inicial a 94°C por 5 min; 40 ciclos: 1 minuto a 94°C para desnaturação, 50 segundos a 58,5°C para anelamento dos primers e 50 segundos a 72°C para extensão; extensão final a 72°C por 10 minutos. Os primers utilizados na detecção do transgene foram: *Forward* (senso) – 5` CCT GCC TTC ATA CGC TAT TTA TTT GCT TG 3` e *Reverse* (antissenso) – 5` GAT CTT GAA ATC ATA GCA GCA ACC GC 3`. O produto da amplificação possui um tamanho de 605pb, pelo anelamento do primer *Forward* (senso) na região terminal do promotor *Ubi-1* (íntron) e do primer *Reverse* (antissenso) na sequência do gene *AtDdm1*.

Em ambas as reações de PCR, foram utilizados controles (positivos e negativos) para a validação dos resultados. Como controle negativo das reações utilizou-se a água ou branco (mix da reação apenas) e plantas de cana-de-açúcar não transformadas ou selvagens (WT). Para o controle negativo, aplicou-se o plasmídeo correspondente ao gene a ser detectado, isto é, o plasmídeo pHA9 para o gene *neo* e o plasmídeo pEP010 para o gene *Ddm1*. As reações de PCR foram analisadas em gel de Agarose 1,2% (TAE 1X, 5V.cm⁻¹).

Avaliou-se, então, o número de plantas transgênicas para os genes *neo* e *Ddm1*, as eficiências de co-transformação e total do processo de transformação, além da porcentagem de escapes (plantas tolerantes a dose de geneticina aplicada, porém sem a presença do gene *neo*).

3.7.2 Confirmação da integração do gene *AtDdm1* via sequenciamento

Para confirmar a integração do gene *AtDdm1* no genoma da cana-de-açúcar e garantir que o produto de PCR das plantas transgênicas obtidas eram realmente do gene *AtDdm1*, certificando que amplificação não tenha sido aleatória ou de um produto

inespecífico, as reações de PCR para 4 plantas transgênicas (amostras 2, 6, 11 e 14 indicadas no item 4.4.1, na Figura 27) foram repetidas (primers detalhados no item 3.7.1) e o produto de PCR reanalisado em gel de agarose 1,2%. As bandas de tamanho esperado foram isoladas, purificadas pelo kit *DNA Gel Extraction* (Fermentas) e encaminhadas para sequenciamento com ET *Dye-terminators* (sequenciador ABI 3100 - Applied Biosystems) utilizando os próprios primers de amplificação na reação de PCR de sequenciamento.

Os cromatogramas gerados pelo sequenciamento referente às bandas das 4 plantas transgênicas foram analisados pelo software *VectorNTI* Suíte 5.0 (Invitrogen) e, posteriormente, avaliadas quanto a similaridade com a sequência original do cDNA do gene *Ddm1* de *Arabidopsis*, através da ferramenta BLAST presente no banco de dados do NCBI (GenBank).

3.7.3 Extração RNA total e síntese de cDNA para RT-PCR

Folhas de 14 dentre as 34 plantas de cana-de-açúcar transgênicas contendo os genes *neo* e *Ddm1* foram coletadas, maceradas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C antes de serem utilizadas para a extração do RNA. O RNA total foi extraído pelo método do Trizol *Reagent* (Invitrogen), de acordo com a metodologia recomendada pelo fabricante. O RNA isolado foi analisado em gel de agarose 1,0% (TAE 1X, $5\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$) para verificação da qualidade do RNA obtido após a extração. A quantificação foi realizada no espectrofotômetro Nanodrop (ThermoScientific). Aproximadamente $5,0\mu\text{g}$ de RNA total foram tratados com *Amplification grade* DNase I livre de RNase (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante, com a intenção de eliminar possíveis contaminações com DNA genômico, o que poderia interferir nas análises de expressão gênica.

Utilizou-se $2,0\mu\text{g}$ do RNA total tratado com DNase I para a síntese do cDNA para cada amostra. Utilizou-se a enzima *Improm-II Reverse Transcriptase* (Promega), tendo o oligo(dT) como o primer da reação.

3.7.4 Normalização e Análise de Expressão do Gene *AtDdm1*

Antes de iniciar a análise de expressão das plantas transgênicas e avaliar a expressão do gene *AtDdm1*, foi necessário normalizar o cDNA a ser utilizado na reação de PCR. Para isso, utilizou-se um gene controle, ou seja, um gene de expressão estável para a condição de análise. O gene controle adotado foi o *GAPDH*, pois apresentou melhor estabilidade para as condições estudadas de acordo com informações preliminares (discutido no item 4.5.1.1). Os primers do gene *GAPDH* foram gentilmente cedidos pelo Dr. Fábio T. S. Nogueira.

As reações de PCR para normalização do cDNA com o gene *GAPDH* controle foram realizadas conforme o protocolo: desnaturação inicial a 94°C por 3 min; 23 ciclos: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C, 30 segundos a 72°C; extensão final a 72°C por 5 minutos. As sequências dos primers são: *Forward* (senso) 5'- TTT GAA TGG CAA GCT CAC TG -3' e *Reverse* (antissenso) 5'- GGT GGA AAC CAA ATC CTC CT -3'. O produto da amplificação possui um tamanho de 180pb.

As reações foram analisadas em gel de agarose 2% (TAE 1X, 5V.cm⁻¹) para comparação da intensidade das bandas. As quantidades de cDNA entre as plantas transgênicas foram ajustadas de modo a terem a mesma expressão para o gene *GAPDH* de modo a estarem perfeitamente normalizadas.

Após normalização, reações de PCR para identificar quais plantas transgênicas possuíam expressão do gene *AtDdm1* foram realizadas de acordo com o seguinte procedimento: 94°C por 3 min; 29 ciclos: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C, 40 segundos a 72°C; extensão final a 72°C por 5 minutos. Os primers desenhados para detecção específica do gene *Ddm1* do transgene foram *Forward* (senso) 5'- TCT GCC TGA CAT CTT TAC ATC ACA TGA T -3' e *Reverse* (antissenso) 5'- GTA ATC TCT CCA ATA AGC GGA ATT TAC CAC - 3'. O fragmento gerado nas reações de PCR possui 461pb.

Avaliou-se também o nível de expressão do retrotransposon TE010. A reação de amplificação se procedeu conforme descrito a seguir: desnaturação inicial a 94°C por 3 min; 29 ciclos: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C, 1 minuto a 72°C; extensão final a 72°C por 5 minutos. O produto de PCR estimado foi de 1100pb.

Os resultados das reações de PCR foram visualizados em gel de agarose 2% (TAE 1X, 5V.cm⁻¹). Analisou-se o nível de expressão do gene *Ddm1* o nível de expressão do retrotransposon TE010 nas plantas transgênicas de cana-de-açúcar. Verificou-se ainda a possível correlação entre a expressão do gene *Ddm1* e a expressão do retrotransposon TE010 para essas plantas.

3.8 Análise da atividade dos LTR Retrotransposon em diferentes estágios do desenvolvimento *in vitro*

Durante o projeto SUCEST, foram identificados 68 elementos de transposição (ETs) em cana-de-açúcar, os quais foram agrupados em 11 famílias (DE ARAÚJO et al., 2005). Esses autores mostraram que dentre os elementos de transposição mais ativos estavam os LTR retrotransposon da família *Hopscotch*, sendo que essa atividade concentrava-se preferencialmente em células de calos (De Araújo et al., 2005). Calos é a principal fonte de células embriogênicas empregadas na transformação genética de cana-de-açúcar atualmente.

Zucchi et al. (2002) observaram que plantas de cana regeneradas *in vitro* a partir de meristemas apresentavam 7% de polimorfismo em relação ao seus clones não introduzidos *in vitro*. Hirochika et al. (1996) mostraram durante a cultura de tecidos de arroz a ativação dos retrotransposons *Tos10* e *Tos17*. O aumento do número de cópias do elemento *Tos17* no genoma após longo período de cultura de tecidos e a inserção do deste na proximidade de genes altamente expressos indicou que a ativação e mobilização do *Tos17* induzidas por cultura de tecidos provocou mutações.

Os elementos da classe I e autônomos, também conhecidos como LTR retrotransposons, realizam a sua transposição por intermédio de uma molécula de mRNA, podendo a expressão ser analisada pelo acúmulo de transcritos. Embora seja bem documentado que TEs estão expressos em nível elevado durante estágio de calos (ZUCCHI et al., 2002; DE ARAÚJO et al., 2005), pouco é conhecido sobre a regulação do acúmulo de seus transcritos e o perfil de expressão em diferentes estágios de desenvolvimento dos calos. Com o intuito de iniciar investigação do controle da expressão de TEs durante o desenvolvimento *in vitro* de cana-de-açúcar, analisou-se a expressão de 4 retrotransposons, os quais estão sumarizados na Tabela 2. O objetivo

dessa análise foi de verificar o padrão de expressão dos 4 LTR retrotransposons durante os estágios do desenvolvimento *in vitro* e identificar possíveis ações para melhor controle da atividade dos retrotransposons durante a cultura de tecidos, etapa indispensável da transformação genética de cana-de-açúcar.

Tabela 2 - Detalhamento de quatro LTR Retrotransposons identificados por De ARAÚJO et al. (2005), que foram analisados quanto a suas atividades durante o desenvolvimento *in vitro* de cana-de-açúcar

Características do LTR Retrotransposon				Tecido onde ocorre a expressão			
N. Acesso	Família	Nome	Tamanho (pb)	Calo	M. apical	Folha (Palmito)	Flor
DQ115018	<i>Hopscotch</i>	TE010	1871	sim	não	sim	sim
DQ115024	<i>Hopscotch</i>	TE028	2915	sim	sim	não	sim
DQ115036	<i>Hopscotch</i>	TE070	1502	não	sim	sim	não
DQ115033	<i>Maggy</i>	TE053	2607	sim	sim	sim	sim

3.8.1 Extração RNA total e síntese de cDNA para RT-PCR

Para a análise da atividade dos quatro LTR Retrotransposons e determinação da transposição de cada elemento (acúmulo do mRNA de cada retrotransposon) durante cada estágio do desenvolvimento *in vitro* de cana-de-açúcar, adotou-se a técnica do RT-PCR semi-quantitativo. Para detecção dos retroelementos, foram desenhados *primers* (iniciadores) (Tabela 3) de acordo com as ESTs disponíveis no NCBI (número de acesso de cada retrotransposon presente na Tabela 2) anotadas por De Araújo et al. (2005).

Os *primers* desenhados segundo a sequência completa do cDNA no *GenBank* (NCBI) foram analisados quanto a T_m (Temperatura de “*melting*”), a formação de dímeros (“*cross-dimers*” and “*self-dimers*”) e a formação de estruturas secundárias (“*hairpins*”) pelo software *VectorNTI* (Invitrogen) .

Tabela 3 - Sequência dos primers desenhados para cada LTR retrotransposon, indicando o tamanho do fragmento esperado.

Elemento	Primer	Sequência	Fragmento Amplificado
TE010	Forward	5'- TCG ACT ACG ATG AGA CCT TCA G -3'	1100pb
	Reverse	5'- TAG ACC GCA CTG ACG TTG TC -3'	
TE028	Forward	5'- GTG GAG GCC AAG TCT GAT ACA - 3'	805pb
	Reverse	5'- CAC TGA CGT TGT CGC AGT AGA - 3'	
TE070	Forward	5'- CAT GGA GGC CAA GTC TGA TAC -3'	806pb
	Reverse	5'- CAC TGA CGT TGT CGC AGT AGA -3'	
TE053	Forward	5'- CTC AGG ATG TGT TGG CTC TGT -3'	1200pb
	Reverse	5'- GGA GGA AGA GTT GCA GTC ACA -3'	

Para verificação da atividade desses elementos durante todo o desenvolvimento *in vitro* da cultura, utilizou-se a variedade de cana-de-açúcar RB835486. Foram coletadas amostras de discos foliares antes de serem introduzidos no meio de cultura MS3c (R₀), de calos de 1 a 6 meses de subcultivo (R₁ a R₆), de calos na luz em início de regeneração (S₁), de calos na luz com a formação das primeiras brotações (S₂) e de plantas regeneradas *in vitro* (P).

As amostras, em triplicata, foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer – 80°C antes de serem utilizadas para a extração do RNA. O RNA total foi extraído pelo método do Trizol *Reagent* (Invitrogen), de acordo com o método recomendado pelo fabricante. O RNA isolado foi analisado em gel de agarose 1,0% (TAE 1X, 5V.cm⁻¹) quanto a sua concentração (µg/µL) e integridade. Aproximadamente 5µg de RNA total foram tratados com *Amplification grade DNase I free of RNase* (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante, no intuito de eliminar possíveis contaminações com DNA genômico.

O RNA total tratado com DNase I foi utilizado para a síntese do cDNA, por meio da enzima *Improm-II Reverse Transcriptase* (Promega), tendo o oligo(dT) como o primer da reação.

3.8.2 Determinação do gene controle e normalização do cDNA

Anteriormente a análise de expressão dos LTR retrotransposons, o cDNA das amostras foi normalizado com dois genes controles. No entanto, inicialmente, quatro genes foram testados, os quais foram genes que codificam para as proteínas

gluteraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), a β -actina, *RPL35.4* e Ubiquitina 2 (*UbiQ2*) uma vez que careciam estudos relacionados à análise de expressão em calos de cana-de-açúcar. Segundo Iskandar et al. (2004), o gene *GAPDH*, dentre outros genes controles testados, como β -actina e subunidades ribossomais, foi o que apresentou maior uniformidade de expressão a partir do cDNA de diferentes tecidos de cana-de-açúcar. O gene de expressão constitutiva *RPL35.4*, responsável pela síntese da proteína L35.4 que compõe a subunidade ribossomal 60S (CALSA JR.; FIGUEIRA, 2007), foi utilizado com sucesso na normalização do cDNA de folhas de cana-de-açúcar (JESUS, 2010).

Os primers de todos os genes controles para as reações de amplificação foram gentilmente cedidos pelo Dr. Fábio T. S. Nogueira. As reações de PCR para normalização do cDNA com todos os genes controles foram realizadas conforme o protocolo: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos; 23 ciclos: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C, 30 segundos a 72°C; extensão final a 72°C por 5 minutos. A sequência dos primers dos genes controles e o tamanho do fragmento amplificado para cada um destes genes está indicado na Tabela 4.

Tabela 4 - Informações dos primers dos genes controles *GAPDH*, *RPL35.4*, β -actina e *UbiQ2* utilizados para análise da normalização do cDNA

Gene Controle	Primer	Sequência	Fragmento Amplificado
<i>GAPDH</i>	Forward Reverse	5`- TTT GAA TGG CAA GCT CAC TG -3` 5`-GGT GGA AAC CAA ATC CTC CT -3`	180pb
<i>RPL35.4</i>	Forward Reverse	5`- CTG AAG ACG GAG AGG GAA AA -3` 5`- GGC GAA GAG AAA CTA ACA C -3`	264pb
β -actina	Forward Reverse	5`- CTT AGG TTG GAT CTT GCT GG -3` 5`- TTA GAA GCA TTT TCG GTG GAC -3`	570pb
<i>UbiQ2</i>	Forward Reverse	5`- CTT CTT CTG TCC CTC CGA TG -3` 5`- TCC AAC CCA AAC TGC TGC TC -3`	159pb

As reações de PCR dos genes controles foram analisadas em gel de agarose 2% (TAE 1X, 5V.cm⁻¹) para comparação da intensidade das bandas entre as amostras (estágios R₀ até P). Realizou-se o controle negativo de cada reação de PCR (RT

negativo) para garantir que confiabilidade nos resultados de expressão.

3.8.3 Análise de expressão dos LTR Retrotransposons TE010, TE028, TE070 e TE053

Para a análise da atividade dos quatro LTR retrotransposons foram realizadas reações de PCR utilizando o mesmo volume de cDNA padronizado com os genes controle *GAPDH* e *RPL35.4*, após a normalização.

Procedeu-se inicialmente a reação de PCR para o elemento TE010, para otimização do número de ciclos. O protocolo adotado foi realizado conforme descrito a seguir: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos; 25 ciclos: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C, 1 minuto a 72°C; extensão final a 72°C por 5 minutos. Após as reações de PCR, as amostras do elemento TE010 foram analisadas em gel de agarose 1% (TAE 1X, 5V.cm⁻¹).

O mesmo procedimento realizado para o elemento TE010 foi adotado para os retrotransposon TE028, TE070 e TE053, no entanto, aumentou-se o número de ciclos para 27 para esses TEs.

Os calos utilizados para transformação genética de cana-de-açúcar são capazes de gerar embriões somáticos (revisão em LAKSHMANAN, 2006). Portanto, a presença de embriões somáticos sugere que tecidos desses calos altamente embriogênicos estão em fase de maior organização celular e próximos a fase inicial da brotação *in vitro*. Para avaliar se os TEs são ou não expressos nessa fase do desenvolvimento *in vitro*, além da caracterização morfológica, testou-se o uso do gene *Kn1* de cana-de-açúcar (*SsKn1*) como padrão molecular do desenvolvimento. O gene *SsKn1* (acesso TC78851) foi identificado a partir do mRNA de milho no banco de dados do NCBI (acesso NM_001111966.2). O gene *Kn1*, homólogo ao *KNOX* de *Arabidopsis*, é determinante na formação do meristema apical e também atua na organização do mesmo. Diante disso, analisou-se sua expressão para determinar os estágios de formação dos embriões somáticos, já que possuem uma estrutura de meristema apical mais organizada do que calos ou estruturas mais desdiferenciadas.

A reação de PCR para verificação do nível de expressão do gene *SsKn1* foi realizada de acordo com o seguinte procedimento: desnaturação inicial a 94°C por 3 min; 28 ciclos: 30 segundos a 94°C para desnaturação, 30 segundos a 58°C para

anelamento dos primers e 30 segundos a 72°C para extensão; extensão final a 72°C por 5 minutos. Os primers utilizados para a amplificação são os seguintes: *Forward* (senso) – 5`- TGA CCT GAA GCA AAT CAA CAA CTG -3` e *Reverse* (antissenso) – 5` CGT GGT GTG AAA TGG AAG CAT C -3`. O fragmento amplificado esperado possui um tamanho de 193pb.

3.8.4 A Análise de expressão dos genes *SsDdm1* e *SsMop1*

Com o intuito de analisar dois genes chaves na regulação epigenética de elementos de transposição, os genes *Ddm1* e *Mop1* de cana-de-açúcar, que atuam respectivamente, no controle transcricional e pós-transcricional dos ETs, foram avaliados quanto à expressão e correlação com a atividade dos retrotransposons em estudo.

A obtenção da sequência e a análise filogenética do gene *SsDDM1* foi detalhada no item 3.4. O gene *SsMop1* (acesso TC86725) foi identificado no banco de dados do NCBI a partir do seu homólogo em milho (acesso ABD72708.1).

A reação de PCR para detecção o nível de expressão do gene endógeno *Ddm1* (*SsDdm1*) foi realizada conforme o protocolo: desnaturação inicial a 94°C por 3 min; 28 ciclos: 30 segundos a 94°C para desnaturação, 30 segundos a 58°C para anelamento dos primers e 30 segundos a 72°C para extensão; extensão final a 72°C por 5 minutos. Os primers utilizados para a amplificação são os seguintes: *Forward* (senso) – 5`- GCG AAT CCA GGC TCA CTT AG -3` e *Reverse* (antissenso) – 5` GCA GCT TCC AAA AGA TCA GG -3`. O fragmento amplificado possui um tamanho de 156pb.

A reação de PCR para análise da presença do gene *SsMop1* foi realizada conforme o protocolo a seguir: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos; 28 a 40 ciclos: 30 segundos a 94°C para desnaturação, 30 segundos a 58°C para anelamento dos primers e 30 segundos a 72°C para extensão; extensão final a 72°C por 5 minutos. Os primers utilizados na detecção do transgene foram: *Forward* (senso) – 5`- TTC TTC GGC AAG CTC TAA CC -3` e *Reverse* (antissenso) – 5`- GGT CCG AGG ACT TTT GTT GA -3`. O produto esperado na amplificação possui um tamanho de 144pb.

Após as reações de PCR para os genes *SsDdm1* e *SsMop1* em cada estágio de desenvolvimento analisou-se os respectivos padrões de expressão em gel de agarose 2% (TAE 1X, 5V.cm⁻¹).

3.9 Análise de expressão do TE010 em diferentes tecidos

As variedades de cana-de-açúcar comerciais, assim como a variedade RB835486, são na maioria das vezes aloploidos derivados da hibridização interespecífica entre as espécies *S. officinarum* (2n = 70-140) e *S. spontaneum* (2n = 36-128). Foi demonstrado que retrotransposons são também ativados pela hibridização interespecífica (KASHKUSH et al., 2002) e, conseqüentemente, contribuem para os rearranjos cromossômicos e a modificação da expressão de genes adjacentes (KASHKUSH et al., 2003).

Diante disso, decidiu-se analisar a expressão do TE010 nas duas principais espécies que compõem o genoma dos híbridos interespecíficos atuais, *S. officinarum* e *S. spontaneum*. Avaliou-se para cada espécie a expressão na lâmina foliar e no ápice caulinar, compreendido pelo “leaf roll” (“palmito”) e o meristema apical.

Além disso, analisou-se o nível de expressão do retrotransposon TE010 em quatro diferentes tecidos da variedade RB835486 de cana-de-açúcar, os quais são representados por limbo foliar, bainha, “leaf roll” ou “palmito” e gema axilar.

A coleta das amostras para ambas as análises (nas duas espécies do gênero *Saccharum* e nos quatro diferentes tecidos da variedade RB835486) foi realizada em plantas com 1-2 meses de idades crescidas em casa-de-vegetação.

O congelamento dos tecidos em nitrogênio líquido, a extração do RNA total pelo método do Trizol, o tratamento do RNA total com DNase I, a síntese de cDNA, a normalização com o gene controle *SsGAPDH*, assim como o procedimento realizado nas reações de PCR foram realizados da mesma maneira como descrito em detalhes no item 3.8.2. Porém, a única diferença refere-se ao número de ciclos empregados nas reações de PCR, que nesse caso passaram a ser 28 ciclos.

Os resultados do nível de expressão do retrotransposon TE010 foram analisados em gel de agarose 2% (TAE 1X, 5V.cm⁻¹).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Indução de calos embriogênicos e regeneração de plantas da variedade RB835486

4.1.1 Meios de indução MS3c e ML1G1

Discos foliares da variedade RB835486 foram cultivados no escuro durante 30 dias nos meios de cultura MS3c e ML1G1 para a indução de calos. Após esse período, avaliou-se a porcentagem de indução de calos embriogênicos (Figura 10) e a localização nos discos foliares (setores) em que os calos foram mais bem induzidos. As observações foram realizadas com auxílio de um estereomicroscópio para identificação das estruturas morfológicas.

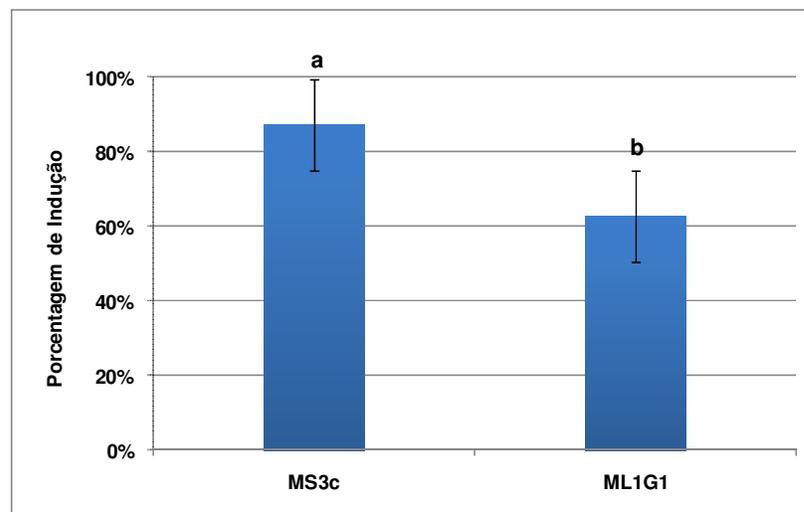


Figura 10 - Representa a porcentagem de indução de calos em função do meio de cultura utilizado para a variedade RB835486. Tratamentos seguidos de letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Em relação à formação dos calos, dos 150 discos introduzidos no meio MS3c 131 formaram calos, o que proporcionou 87,3% de indução, mostrando-se melhor quando comparado ao meio ML1G1, o qual apresentou 62,7% de indução, equivalente a 94 discos dos 150 introduzidos no meio de cultura. Os resultados obtidos por esse experimento foram estatisticamente diferentes segundo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Na sequência, analisou-se a indução de calos em função dos setores, nos quais os discos foram subdivididos (Figura 2) e observou-se que para o meio de cultura MS3c

os setores 1, 2 e 3 não apresentaram diferença significativa na porcentagem de indução de calos, isto é, a posição do disco não interferiu na porcentagem de indução de calos induzidos em meio MS3c. No entanto, para o meio ML1G1, a maior porcentagem de indução de calos ocorreu no setor 1, indicando que a posição do disco interferiu na quantidade de calos induzidos (Figura 11), conforme inferência estatística pelo método de Tukey ($P < 0,05$).

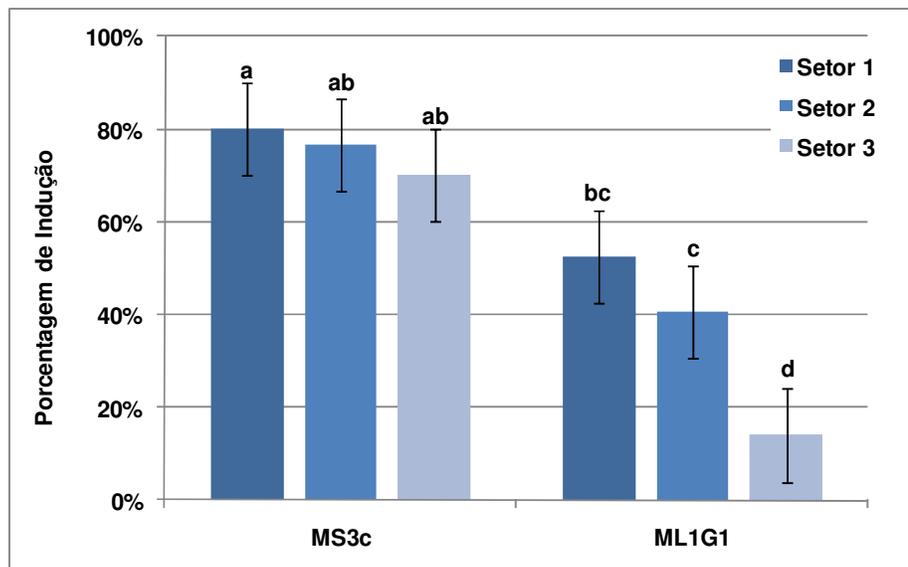


Figura 11 - Porcentagem de indução de calos, para a variedade RB835486, em função do meio de cultura e do setor em que ocorre a indução (setor). Tratamentos seguidos de letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Entretanto, não foi analisada apenas a porcentagem de indução (parâmetro quantitativo), avaliou-se também a qualidade dos calos induzidos em função dos setores e do meio de cultura empregado, no intuito de obter calos morfogênicos altamente embriogênicos visando a transformação genética. Os calos inicialmente induzidos em cada setor foram separados e transferidos para meio fresco (manteve-se sempre o meio inicialmente utilizado na indução). A cada quatro semanas, os explantes foram subcultivados para meio fresco. Após o quarto subcultivo, analisou-se, então, a qualidade dos calos formados. Essa análise teve como fundamento as observações realizadas por Guiderdoni e Demarly (1988), que mostraram através de análises histológicas nos discos foliares que dois tipos de calos morfogênicos foram formados durante o processo de indução, um nodular e outro friável, os quais originaram de

regiões diferentes do explante (disco foliar) e apresentaram características morfológicas e histológicas distintas.

Com base nas características morfogênicas apontadas nesse estudo constatou-se a presença de basicamente 3 tipos de calos, dois com características morfogênicas e outro com aspecto não morfogênico (Figura 12). Os calos com característica morfogênica foram diferenciados em dois tipos, o primeiro formado por calos embriogênicos altamente friáveis de coloração amarelo-clara, que apresentam rápida proliferação celular (Figura 12B); e o segundo, contendo calos embriogênicos de estrutura nodular e compacta, com coloração branca e opaca, e com grau de diferenciação maior (Figura 12C). Já o calo com aspecto não morfogênico apresentam calos translúcidos e mucilaginosos, de comportamento não morfogênico na maioria das vezes (Figura 12D).

Os calos com características morfogênicas foram principalmente induzidos no meio de cultura MS3c, sendo que os calos embriogênicos de aspecto nodular e compacto foram formados predominantemente no setor 3, enquanto os calos embriogênicos altamente friáveis e de rápida proliferação celular foram induzidos em grande maioria no setor 1 (folhas mais imaturas). Já para o meio de indução ML1G1, verificaram-se basicamente calos de aspecto não morfogênico para os três setores, porém no setor 1, eventualmente, ocorreu a formação de calos friáveis com característica embriogênica.

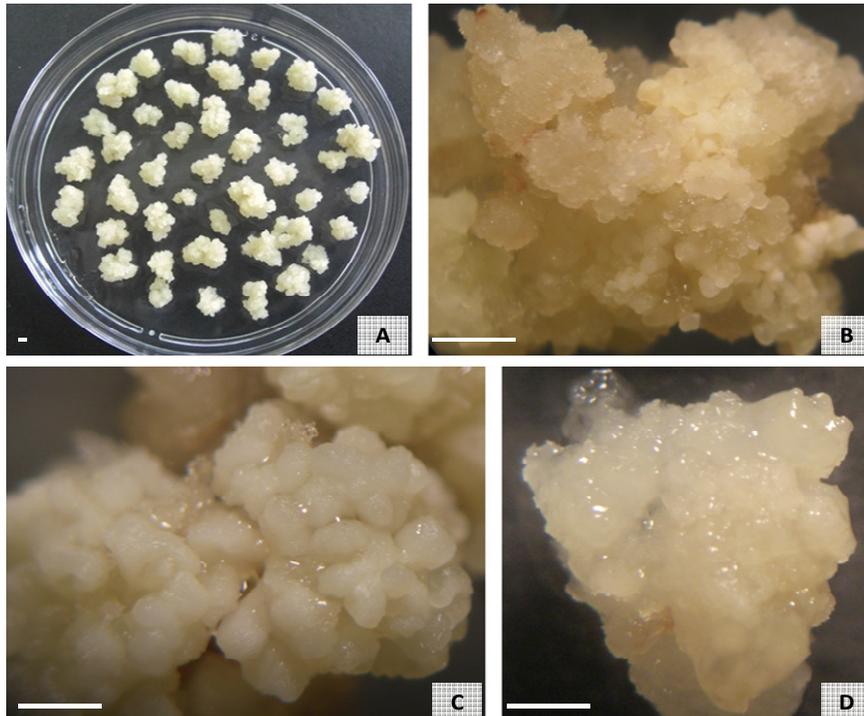


Figura 12 - (A) Placa contendo basicamente dois tipos principais de calos da variedade RB835486: morfogênicos e não morfogênicos. (B) Calos morfogênicos de coloração amarelo-claro, altamente friáveis e de rápida proliferação celular. (C) Calos morfogênicos com estrutura nodular e compacta, de coloração branca e opaca. (D) Calos não morfogênicos, com aspecto mucilaginoso. Barra = 1mm

Verificou-se que para a variedade RB835486 o meio MS3c foi melhor na comparação com o meio ML1G1, pois apresentou melhor indução de calos com características morfogênicas, isto é, o meio MS3c proporcionou melhor formação de calos embriogênicos. Este meio também foi utilizado com sucesso para indução de calos embriogênicos em outras variedades brasileiras de cana-de-açúcar visando a transformação genética (FALCO; TULMANN NETO; ULIAN, 2000; MELOTTO-PASSARIN, 2009).

4.1.2 Teste de regeneração de plantas

Apesar da regeneração de plantas de cana-de-açúcar a partir de calos ser geralmente realizada em meio desprovido de reguladores de crescimento e na presença de luz (TAYLOR et al., 1992; FALCO et al., 1996, 2000; MELOTTO-PASSARIN, 2009) também pode ser potencializada através da aplicação de diferentes hormônios vegetais (CHENGALRAYAN; GALLO-MEAGHER, 2001). Aliado a isso, em

virtude da resposta morfogênica ser fortemente influenciada pelo genótipo, é fundamental que adaptações dos protocolos de regeneração sejam realizadas para cada cultivar a ser utilizada (CIDADE et al., 2006).

Calos embriogênicos da variedade RB835486, no estágio de subcultivo R₄, induzidos em meio MS3c foram transferidos para os meios de regeneração MSAc (controle), SRM, ML1R3, ML1R4, na luz, sob 16 horas de fotoperíodo (intensidade luminosa de $50\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e a $27\pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura, durante 30 dias. Analisou-se o número médio de brotações formadas e o número médio de plantas regeneradas por explante responsivo (Figura 13).

O número de brotações obtidas nos meios de regeneração ML1R4, MS e SRM foi estatisticamente idêntico, apresentando um valor médio de 8 brotações por explante. Já para o número de plantas regeneradas, o meio MSAc proporcionou a regeneração de 5,2 plantas por explante responsivo, sendo maior quando comparado aos demais tratamentos (Figura 13). Os meios ML1R4 e SRM, apesar do número de brotações iguais ao obtido no meio MS, apresentaram regeneração de plantas menor que o valor conseguido em meio MS, em virtude do baixo desenvolvimento das brotações formadas, isto é, apesar da formação de cerca de 8 brotações por explante, essas brotações retardaram o desenvolvimento para formação de plantas (parte aérea e raízes desenvolvidas). Esse fato possivelmente ocorreu em virtude de um desequilíbrio hormonal proporcionado pela maior quantidade de NAA empregada nesses dois meios na regeneração, retardando o desenvolvimento das brotações para a formação das plantas, pois uma vez que as brotações induzidas nos meios ML1R4 e SRM foram transferidas para meio MSAc, estas rapidamente se desenvolveram e formaram pequenas plântulas, similarmente ao ocorrido quando os calos foram transferidos imediatamente ao meio MSAc.

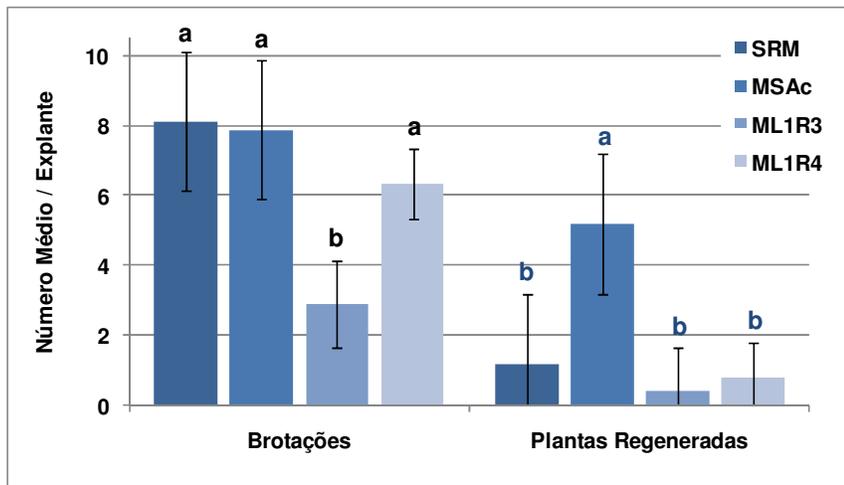


Figura 13 - Análise da regeneração a partir de calos, da variedade RB835486, após 30 dias nos meios de regeneração, sob fotoperíodo de 16 horas. Tratamentos seguidos de letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Análises estatísticas independentes para média de brotações e para média de plantas regeneradas (letras com cores diferentes)

Esse resultado confirmou os resultados de Taylor et al. (1992), Falco et al. (1996, 2000) e Melotto-Passarin (2009) os quais concluíram que regeneração a partir de calos embriogênicos ocorreu preferencialmente em meio desprovido de reguladores de crescimento.

4.1.3 Efeito da água de coco

O objetivo desse teste foi verificar se, para a variedade RB835486, a água de coco seria indispensável para indução eficiente de calos embriogênicos com capacidade de regenerar plantas e também se a água de coco poderia ser substituída por cinetina. A utilização de água de coco em meios de cultura possui controvérsias por não ter sua composição padronizada e mensurada. Alternativamente ao uso da água de coco (50ml.L^{-1}) no meio de cultura MS3c, utilizou-se a dose de $0,1\text{mg.L}^{-1}$ da cinetina, a qual está relacionada ao aumento da divisão e proliferação celular durante a indução de calos *in vitro* (CALDAS et al., 1998). O uso desta citocinina em objeção ao uso água de coco tem sido realizado pelo fato da água de coco utilizada não possuir sua composição padronizada e mensurada, pois é sabido que, por se tratar do endosperma líquido do coco, a água de coco possui alguns biorreguladores vegetais como auxinas, citocininas e giberelinas, além de outros componentes orgânicos como açúcares e aminoácidos (CALDAS et al., 1998).

Diante disso, foram analisados três meios de cultura (tratamentos) quanto à indução de calos morfogênicos: MS3c (controle), MS3 e MS3k. Discos foliares introduzidos em cada um dos três meios de cultura, incubados no escuro, foram subcultivados a cada 3-4 semanas e transferidos para meio fresco até o quarto subcultivo (estágio R₄), momento no qual se analisou a porcentagem de indução de calo (Figura 14) e a qualidade dos calos formados.

Com base na porcentagem de indução de calos, ou seja, no número de explantes com calos formados, não houve diferença significativa entre os três meios testados. Analisando-se a qualidade dos calos, foi verificado que referente ao parâmetro oxidação, constatou-se um valor baixo os três meios de cultura avaliados, não havendo diferença significativa entre eles segundo inferência estatística de Tukey ($P < 0,05$). Essa baixa oxidação constatada foi determinada, principalmente, pela adição do antioxidante ácido cítrico (150mg.L^{-1}) ao meio de cultura (MS3c), o qual proporcionou resultados similares aos obtidos por Lakshmanan et al. (2006) e Melotto-Passarin (2009) quando utilizaram a mesma concentração de ácido cítrico em seus respectivos meios de cultura de indução de calos.

No entanto, quando considerado a quantidade de calos morfogênicos, representado por calos embriogênicos, (Figura 4B e 4C), o meio MS3c com água de coco mostrou-se melhor na indução e formação desse tipo de calo em comparação aos meios MS3c sem água de coco e MS3c sem água de coco e suplementado com $0,1\text{mg.L}^{-1}$ de cinetina, conforme verificado pelo método estatístico de Tukey ($P < 0,05$).

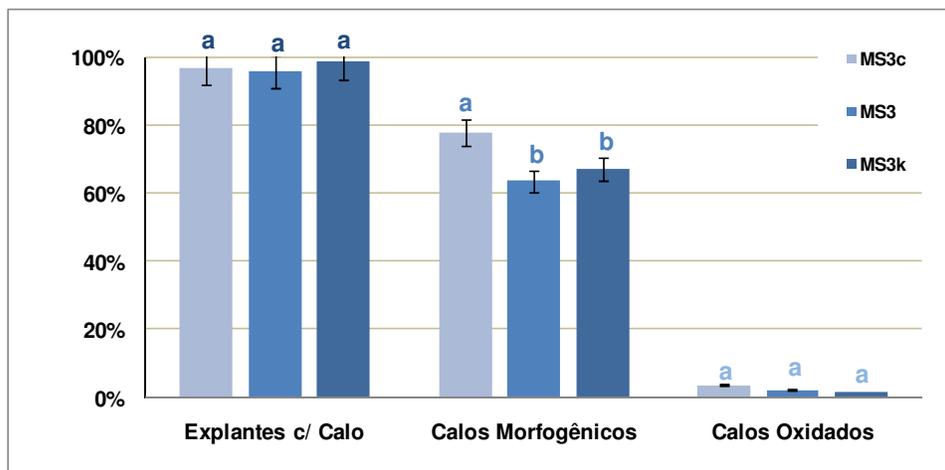


Figura 14 - Porcentagem de indução de calos, de calos oxidados e de calos morfogênicos induzidos para a variedade RB835486, até o quarto repique (R_4) em função do meio de cultura. Tratamentos seguidos de letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Diante desses resultados de indução de calos, o meio MS3c (controle) mostrou-se melhor na indução de calos embriogênicos até o subcultivo R_4 , sugerindo que a utilização da água de coco propiciou um melhor balanço entre os biorreguladores auxinas e citocininas para a proliferação celular e formação de calos altamente embriogênicos. Esse balanço entre a auxina sintética 2,4-D, utilizada no meio de indução MS3c, que é considerado mais efetivo para a indução de calos embriogênicos em cana-de-açúcar, (HO; VASIL, 1983; CHEN et al., 1988; FITCH; MOORE, 1990; LIU, 1993; CHENGALRAYAN; GALLO-MEAGHER, 2001; DESAI et al., 2004; LAKSHMANAN et al., 2006; HEERDT, 2008) e a água de coco, que geralmente apresenta um comportamento similar a adição de uma citocinina, devido a sua composição conter citocininas naturais (CALDAS et al., 1998; MELOTTO-PASSARIN, 2009), foi, então determinante, para proporcionar rápida proliferação celular e manter o status de dediferenciação, sem levar a diferenciação efetiva do tecido, levando a formação de calos altamente embriogênicos.

Entretanto, a regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos ocorre geralmente em meio desprovido de reguladores de crescimento e na presença de luz (TAYLOR et al., 1992; FALCO et al., 1996, 2000; MELOTTO-PASSARIN, 2009), podendo ser potencializada por diferentes hormônios vegetais (CHENGALRAYAN; GALLO-MEAGHER, 2001).

Diante disso, após a indução de calos nos meios de cultura MS3c, MS3 e MS3k, buscou-se avaliar se os calos embriogênicos (subcultivo R₄) diferentemente induzidos, mas morfológicamente similares, apresentariam diferenças na capacidade de regeneração de plantas.

Após 30 dias em meio de regeneração MSAc, sob fotoperíodo de 16h (intensidade luminosa de $50\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) e temperatura de $27\pm 1^\circ\text{C}$, analisou-se o número médio de brotações formadas, isto é, a parte aérea regenerada sem o sistema radicular desenvolvido; e o número médio de plantas regeneradas por explante (parte aérea e sistema radicular desenvolvidos) (Figura 15).

O número médio de brotações formadas e plantas regeneradas por explante obtido a partir dos calos embriogênicos no meio MS3c (controle de indução) ficou entre três a quatro vezes superior aos obtidos a partir dos calos morfogênicos nos demais meios de indução. O valor médio de brotações e de plantas regeneradas por explante responsivo foi, respectivamente, 8,7 e 6,3 (Figuras 15). Isso sugere concluir que apesar dos calos serem morfológicamente parecidos, o estado fisiológico e composição hormonal endógena, em virtude do balanço hormonal entre auxina e citocinina nos calos embriogênicos, potencializadas pela adição do 2,4-D ($3,0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e da água de coco ($50\text{ml}\cdot\text{L}^{-1}$), possivelmente foram os causadores dessa melhor resposta regenerativa (Figura 16).

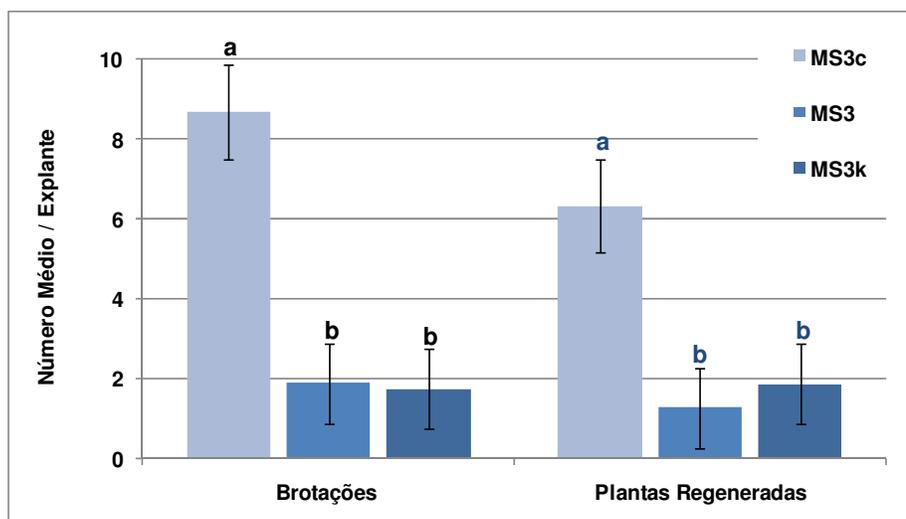


Figura 15 - Análise da regeneração a partir de calos R₄, da variedade RB835486, após diferente indução de calos morfogênicos. Tratamentos seguidos de letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Análises estatísticas independentes para média de brotações e para média de plantas regeneradas (letras com cores diferentes)

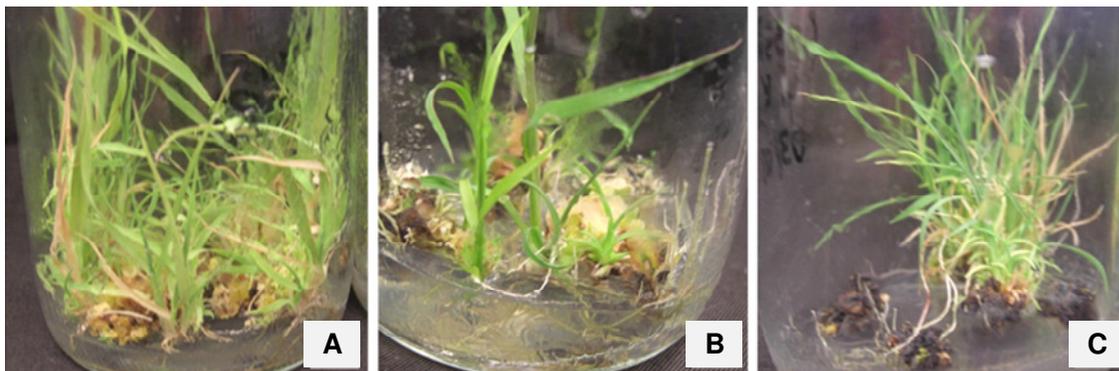


Figura 16 - Regeneração de plantas, da variedade RB835486, em meio MSAc após indução de calos embriogênicos em meio MS3c (A), MS3 (B) e MS3k (C)

Com o objetivo de obter maior controle da proliferação celular em cultura de tecidos e diferenciação celular em plantas, contribuindo para maior eficiência no processo de regeneração de plantas, verificou-se que os calos embriogênicos, da variedade RB835486, quando induzidos em meio MS3c, proporcionaram maior número de plantas regeneradas por explante responsivo, sendo assim, indicado para a indução e formação de calos embriogênicos visando rápida regeneração de plantas.

4.1.4 Efeito da aplicação exógena do peptídeo hormonal sintético CLV3 na regeneração de plantas

O dodecapeptídeo CLV3 se mostra geneticamente idêntico a proteína CLAVATA3, sendo responsável em suprimir a proliferação de células em gemas meristemáticas, tais como meristema apical e radicular (ITO et al., 2006; WILLIAMS et al., 2005), determinando o destino das células nesses meristemas, onde o balanço entre a divisão das células embrionárias e a diferenciação das células deve ser mantida para o crescimento vegetal (RYAN et al., 2002).

Para testar o efeito da aplicação do dodecapeptídeo CLV3 (RTVPSGPDPLHH) na regeneração de plantas, calos embriogênicos induzidos em meio MS3c, até o subcultivo R4, foram transferidos para o meio de regeneração MSAc suplementado com crescentes concentrações do peptídeo hormonal CLV3: 0, 1, 5, 10 e 25 μ M. Avaliou-se para cada tratamento o número médio de brotações formadas e o número médio de plantas regeneradas por explante responsivo.

Após 15 dias nas placas em meio de regeneração, verificou-se que o número de brotações por explante foi maior no meio MSAc contendo 25 μ M de CLV3, cuja dose representa a maior testada no experimento (Figura 17). Em relação ao controle (0 μ M de CLV3 – Figura 18A), houve um aumento de 63,7% na quantidade média de brotações por explante responsivo. As concentrações de 1, 5 e 10 μ M de CLV3 (esta última concentração em detalhes na Figura 18B) não foram estatisticamente diferentes do controle. Esse resultado sugere que a aplicação exógena de 25 μ M de CLV3 (Figuras 18C e 18D) pode ter estimulado as células meristemáticas a seguirem uma rota de diferenciação, levando a maior formação dos primórdios foliares e posteriormente ao aumento das brotações formadas, devido a alocação das células meristemáticas para os primórdios foliares, conforme destacado por Müller et al. (2006).

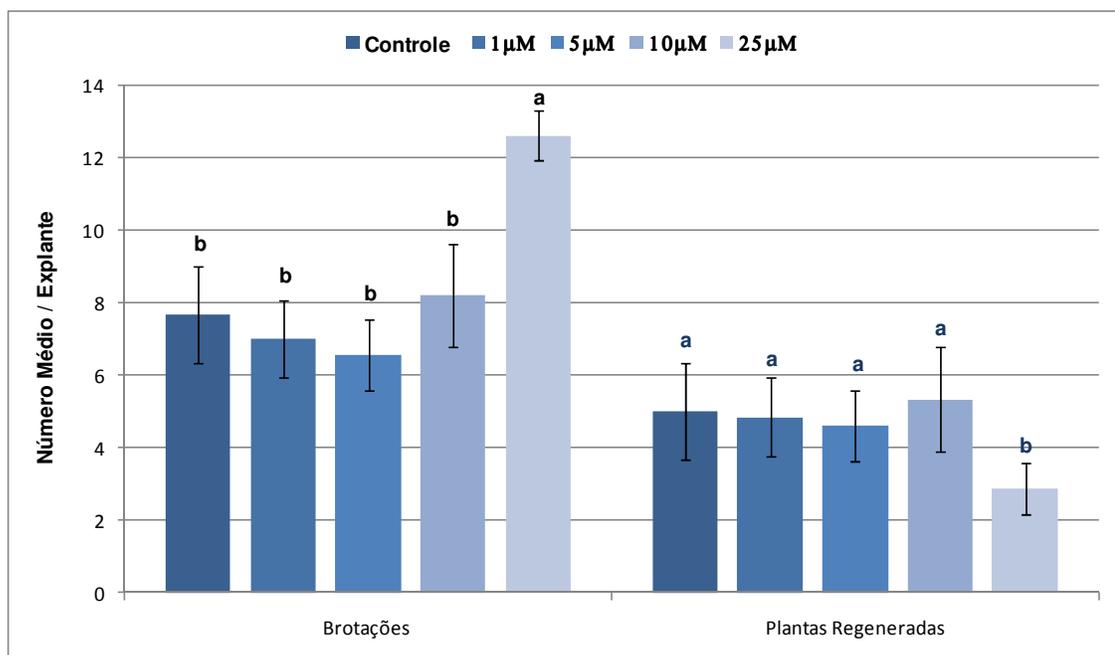


Figura 17 - Análise da regeneração a partir de calos, da variedade RB835486, em meio MSAc suplementado com 5 concentrações do dodecapeptídeo CLV3. Tratamentos seguidos de letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Análises estatísticas independentes para média de brotações e para média de plantas regeneradas (letras com cores diferentes)

Em *Arabidopsis*, a concentração de 1 μ M do peptídeo CLV3 promoveu a redução do meristema apical. Já em arroz, a aplicação exógena do dodecapeptídeo CLV3 nas concentrações de 1 μ M e 5 μ M não apresentaram efeito na estrutura do meristema (KINOSHITA et al., 2007). Diversos estudos mostraram que o excesso de CLV3 pode

aparentemente promover diferenciação a partir de células (FIERS et al., 2005). Müller et al. (2006) mostraram que o aumento de *CLV3* na região meristemática apical restringe o crescimento do meristema e promove a alocação das células da zona periférica do meristema para os primórdios foliares.

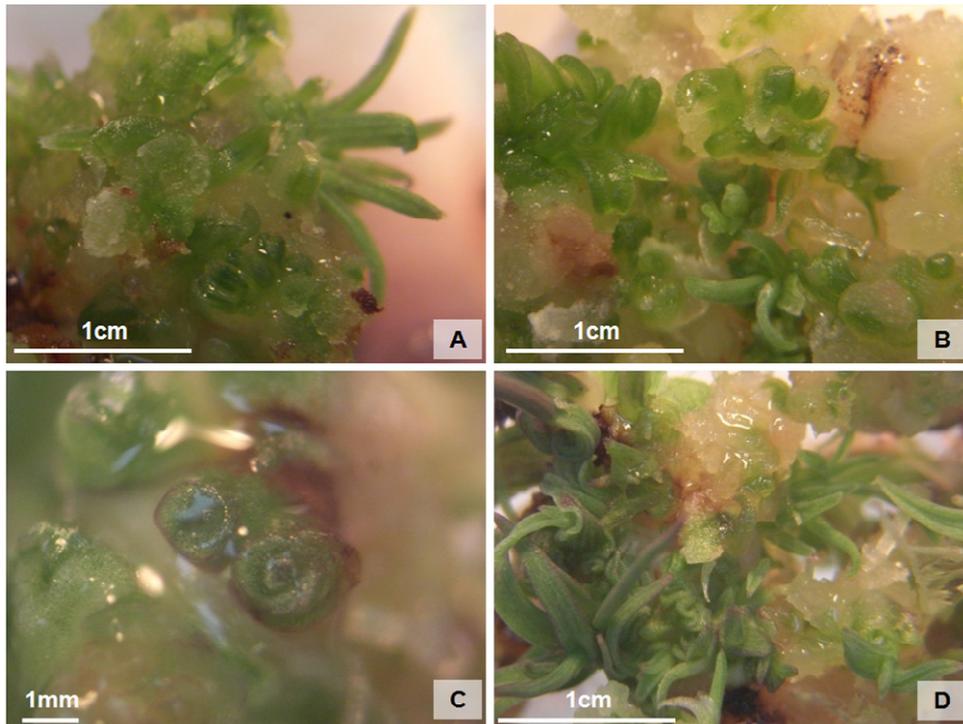


Figura 18 - Fotografias obtidas em estereoscópio durante o processo de formação das brotações nos meios MSAc suplementado com 0 μ M (A), 10 μ M (B) e 25 μ M de CLV3 (C,D). As estruturas em detalhe na imagem C assemelham-se a uma “rosa”, o que sugere possivelmente a diminuição da região meristemática e formação acentuada dos primórdios foliares

As brotações foram transferidas para meio MSAc e após 30 dias avaliou-se o número de plantas regeneradas por explante (Figura 19). As brotações formadas nos meios MSAc com 0 μ M (controle), 1 μ M, 5 μ M e 10 μ M de CLV3 foram estatisticamente iguais e apresentaram 67% mais plantas regeneradas que as brotações formadas no meio MSAc suplementado com 25 μ M de CLV3 (Figura 13).

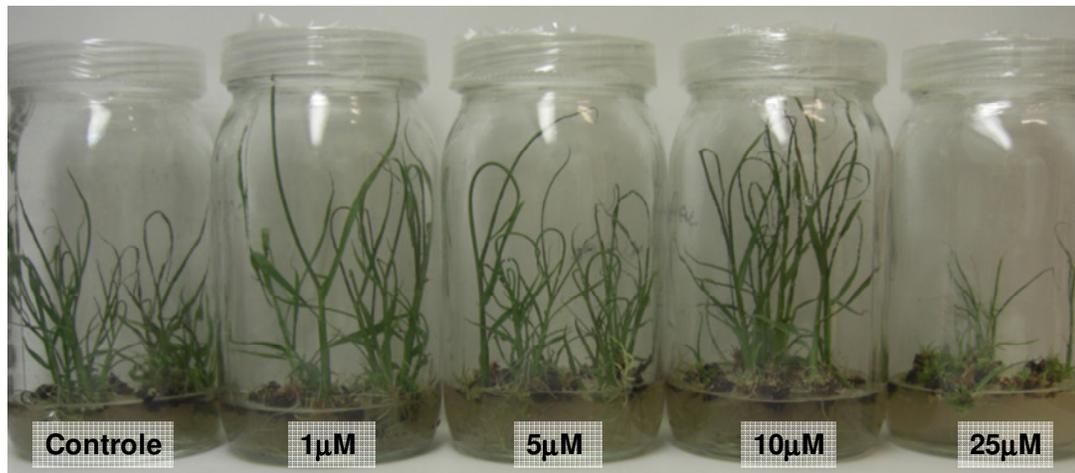


Figura 19 - Plantas regeneradas em meio MSAc após 30 dias da transferência das brotações formadas nos meios MSAc com 0 μ M (controle), 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M e 25 μ M, respectivamente

No entanto, o menor número de plantas regeneradas proporcionado pelo tratamento com 25 μ M de CLV3 foi devido a grande quantidade de brotações formadas e possivelmente ao fato de que o aumento do número de brotações foi devido a alocação das células meristemáticas para região de formação dos primórdios foliares, o que pode ter levado a uma redução das células meristemáticas (controle negativo do gene *WUS*) e retardado o crescimento das plantas, conforme discutido por Müller et al. (2006). Após o período do experimento, verificou-se que as plantas com crescimento retardado, seguiram o desenvolvimento normal e formaram cerca de 40% mais plantas regeneradas em relação aos quatro primeiros tratamentos.

Sendo assim, a utilização do dodecapeptídeo CLV3 no controle do desenvolvimento de células meristemáticas pode levar a um incremento na diferenciação, podendo contribuir para uma maior eficiência no processo de regeneração de plantas.

4.1.5 Efeito da aplicação exógena do peptídeo hormonal PSK- α na regeneração de plantas

Matsubayashi e Sakagami (2000) mostraram o efeito do peptídeo PSK- α no aumento da divisão celular e/ou a diferenciação celular. Recentemente, Ahmadabadi et al. (2007) utilizaram PSK- α na regeneração de milho a partir de calos e obtiveram resultados satisfatórios, concluindo que a concentração otimizada de 30nM de PSK- α

favoreceu não só a proliferação celular, mas também a formação de embriões e a regeneração de plantas.

Para analisar o efeito da aplicação do pentapeptídeo sulfatado fitosulfoquina alfa (PSK- α) na regeneração de plantas, calos embriogênicos induzidos em meio MS3c, até o subcultivo R₄, foram transferidos para o meio de regeneração MSAc suplementado com crescentes concentrações do peptídeo hormonal PSK- α : 0, 15, 30 e 45nM. Foram avaliados para cada tratamento o número médio de brotações formadas e o número médio de plantas regeneradas por explante.

Após 30 dias de regeneração, tanto para a média de brotações formadas, quanto para a média de plantas regeneradas por explante, o meio de regeneração MSAc acrescido de com 30nM mostrou-se superior aos demais tratamentos, com os valores de 11 e 9.3, respectivamente (Figura 20).

A adição de PSK- α mostrou-se efetiva na proliferação celular (Figura 21), conforme relatado por Matsubayashi e Sakagami (2000).

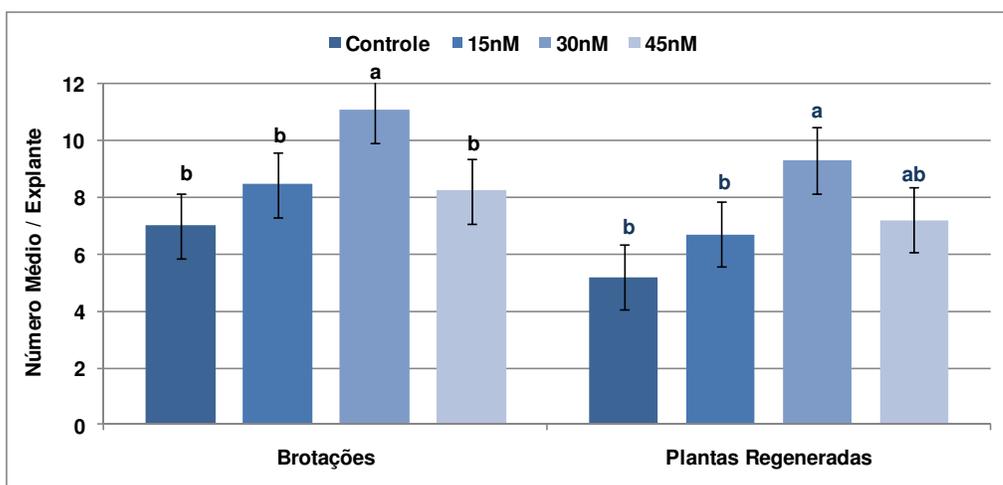


Figura 20 - Análise da regeneração de plantas da variedade RB835486 a partir de calos embriogênicos em meio MSAc suplementado com 4 concentrações do pentapeptídeo sulfatado PSK- α . Tratamentos seguidos de letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Análises estatísticas independentes para média de brotações e para média de plantas regeneradas (letras com cores diferentes)

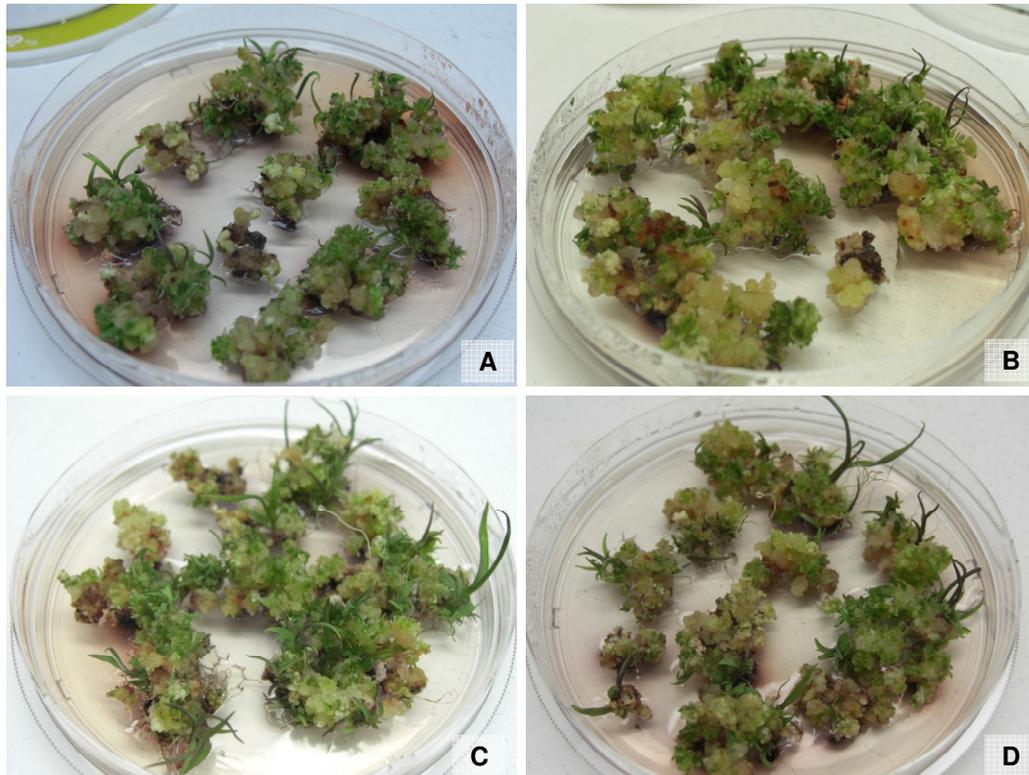


Figura 21 - Brotações formadas e início da regeneração de após 15 dias dos calos embriogênicos da variedade RB835486 em meio MSAc acrescido de 0nM –controle- (A), 15nM (B), 30nM (C) e 45 nM (D) do peptídeo hormonal PSK- α .

O peptídeo PSK- α foi originalmente descrito como um peptídeo hormonal estimulador da regeneração em arroz (MATSUBAYASHI et al., 1997). Em milho, PSK- α apresentou ser ativo em concentrações de nanomolar, sendo a adição entre 30 e 75nM de PSK- α estimulou fortemente a embriogênese a partir de folhas imaturas na luz (AHMADABADI et al., 2007). Esses mesmos autores afirmaram que o sistema de cultura de tecidos empregado, utilizando PKS- α , poderia ser útil para regeneração de plantas visando um sistema de transformação genética.

Dessa forma, a utilização do pentapeptídeo sulfatado PSK- α pode ser importante no processo de cultura de tecidos de cana-de-açúcar, pois possibilita um aumento da proliferação celular e da regeneração de plantas, o que se traduz num efeito desejável visando a transformação genética de cana-de-açúcar.

4.2 Regeneração de plantas a partir de discos foliares

Segundo Lakshmanan et al. (2006) a utilização de secções transversais de folhas imaturas, denominados discos foliares, para regeneração direta de plantas ao invés da utilização de calos, mostrou-se favorável. Franklin et al. (2006) utilizando uma pré-indução com 2,4-D nos explantes, também obtiveram regeneração de plantas. Snyman et al. (2006), mostraram a regeneração de plantas a partir de embriogênese direta de discos foliares com e sem pré-formação de inflorescência.

Esses resultados indicam a possibilidade de redução do tempo para obtenção de plantas *in vitro*, comparados ao sistema que vem sendo amplamente utilizado visando a transformação genética de cana-de-açúcar, representado pelos calos embriogênicos. Essa rápida regeneração de plantas apresenta uma estratégia efetiva para substancialmente reduzir o período total *in vitro*, assim como o período das culturas no estágio de calos, a fim de evitar ou minimizar a variação somaclonal, a qual representa um efeito indesejável para propagação comercial e transformação genética de cana-de-açúcar (LAKSHMANAN et al., 2006).

Nesse contexto, discos foliares da variedade RB835089 pré-induzidos nos meios MS3c e ML1G1 por um período de 15 ou 30 dias, foram avaliados quanto ao número de brotações formadas e número de plantas regeneradas por explantes para os meios de regeneração MSAc, SRM, ML1R3, ML1R4.

Os dados referentes ao período de 15 dias de pré-indução (Figura 22), mostraram que os tratamentos com a pré-indução no meio MS3c e regeneração nos meios SRM e MS apresentaram, respectivamente, 8,63 e 9,93 brotações por explante responsivo; e 6,98 e 7,13 plantas regeneradas por explante responsivo. Os demais tratamentos apresentaram valores significativamente menores, tanto para número médio de brotações quanto para número médio de plantas regeneradas, conforme analisado pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Para o experimento realizado com 30 dias de pré-indução (Figura 23), foi verificado que os tratamentos pré-induzidos com o meio MS3c e regenerados nos meios SRM e MS apresentaram, respectivamente, 6,96 e 5,20 brotações por explante responsivo; e 4,26 e 3,53 plantas regeneradas por explante responsivo. Os dois meios não apresentaram diferença estatística entre si, todavia apresentaram valores

superiores aos demais tratamentos quando comparados estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

De acordo com os resultados obtidos, permite-se afirmar que para os discos foliares da variedade RB835089, a pré-indução por 15 dias em meio MS3c é a mais indicado, sendo que tanto o meio SRM quanto o meio MS poderiam ser empregados para a regeneração de plantas.

O período total transcorrido para a regeneração de plantas desde a introdução dos explantes *in vitro* a partir dessa metodologia utilizando discos foliares foi de cerca de 6 a 8 semanas, enquanto que a partir de calos o período para obtenção de plantas varia de 10 a 12 semanas a partir da introdução em cultura de tecidos. A obtenção de plantas utilizando discos foliares como explantes não só reduziu o período *in vitro*, mas também minimizou o tempo de cultura no estágio de calos, fatores os quais estão fortemente relacionados ao fenômeno da variação somaclonal (HIROCHIKA et al., 1993, 1996; 2000; ZUCCHI et al., 2002; LAKSHMANAN et al., 2006).

Sendo assim, a utilização de protocolos para obtenção rápida de plantas a partir de discos foliares, como realizado para a variedade RB835089, pode ser uma ferramenta estratégica na propagação comercial e transformação genética de cana-de-açúcar uma vez que possibilita acelerar ambos os processos e evita ou minimiza as condições que potencializam a ocorrência de variação.

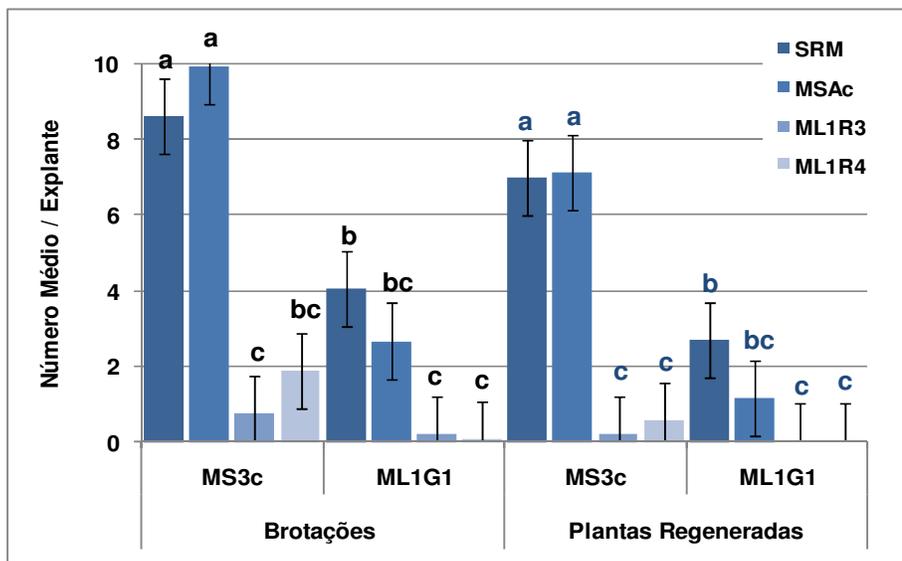


Figura 22 - Análise da regeneração de plantas da variedade RB835089, a partir de discos foliares pré-induzidos por 15 dias. Tratamentos seguidos de letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Análises estatísticas independentes para média de brotações e para média de plantas regeneradas (letras com cores diferentes).

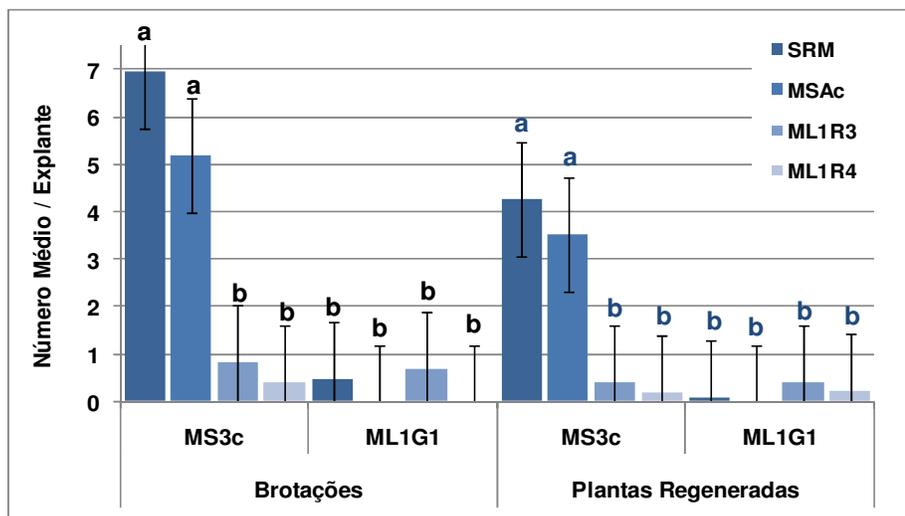


Figura 23 - Análise da regeneração a partir de discos, da variedade RB835089, após 30 dias de pré-indução. Tratamentos seguidos de letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Análises estatísticas independentes para média de brotações e para média de plantas regeneradas (letras com cores diferentes)

4.3 Estudo do gene *Ddm1* para construção do vetor de transformação genética de cana-de-açúcar

4.3.1 Análise *in silico* do gene *AtDdm1* e da proteína *AtDDM1*

A análise *in silico* do gene *Ddm1* de *A. thaliana* (*AtDdm1*) foi realizado no intuito de gerar informações para caracterização molecular e identificação da proteína DDM1. Comparou-se a proteína DDM1 de Arabidopsis com as proteínas de alguns membros pertencentes a família Poaceae, porém mais próximas filogeneticamente a cana-de-açúcar, como sorgo, milho e arroz, a fim de determinar a escolha do gene (responsável pela codificação da proteína) mais adequado para transformação genética de cana-de-açúcar.

O locus do gene *AtDdm1* (acesso no TAIR pelo número AT5G66750) está localizado entre 26,64 e 26,66 Mb no cromossomo 5 de Arabidopsis. Possui o tamanho de 4123pb, apresentando 16 éxons e 15 íntrons (Figura 24A). A região codificadora do gene *AtDdm1*, representado pelo cDNA sintetizado a partir do mRNA, contendo apenas a ORF (traduzida do inglês, “Quadro Aberto de Leitura”, que representa a região entre o códon de iniciação e de terminação) possui 2295pb (número de acesso no *GenBank*: NM_126073.2. Figura 24B). Essa região do cDNA de *AtDdm1* foi amplificada e clonada no plasmídeo pEP10 para a construção do vetor de transformação.

Este gene codifica uma proteína composta de 764 aminoácidos e de aproximadamente 86,6kDa (número de acesso no *GenBank* NP_201476.1). A proteína *AtDDM1* apresenta três domínios conservados (Figura 24C), os quais a caracterizam como uma ATPase-dependente envolvida no remodelamento da cromatina com homologia às proteínas SWI2/SNF-2 e na metilação do DNA (JEDDELOH et al., 1999; BRZESKI et al., 2003).

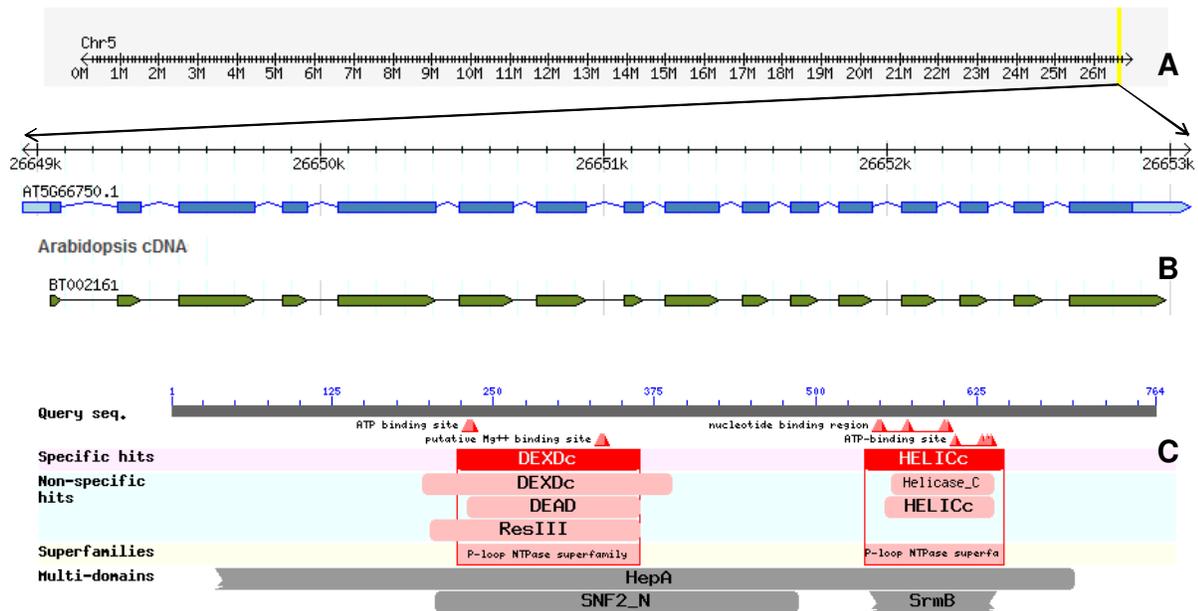


Figura 24 - Caracterização do gene *AtDdm1*. (A) Lócus do gene *Ddm1* no cromossomo 5 de *Arabidopsis*. Os blocos azuis representam os éxons e as linhas azuis os íntrons (B) Representa o mRNA não processado. A ORF representando o cDNA é mostrado apenas pelos blocos verdes. (C) Os domínios conservados presente na proteína *AtDDM1*

4.3.2 Análise filogenética da proteína DDM1 na família Poaceae

Para análise de filogenia, a proteína DDM1 e do cDNA de *A. thaliana* (acessos NP_201476.1 e NM_126073.2, respectivamente) foram utilizados como referência na busca de proteínas com sequências similares, nas espécies da família Poaceae mais próximas a cana-de-açúcar. As sequências obtidas pela busca por meio da sequência do cDNA de *Arabidopsis*, foram depois traduzidas para sequência de proteína para a análise filogenética. A ferramenta de bioinformática utilizada na busca foi o BLAST, presente em diversos bancos de dados públicos como NCBI, TIGR, Chrom DataBase (arroz, sorgo e milho), Gramene (arroz, milho, sorgo, cana-de-açúcar), Phytozome (arroz e sorgo) e SUCEST (cana-de-açúcar).

Foram obtidas as sequências de aminoácidos das proteínas DDM1 das espécies da família Poaceae em estudo, como a proteína *SsDDM1* (*Saccharum* spp., sequência gerada pela tradução da sobreposição de vários acessos – formação do “cluster”), duas proteínas em milho, *ZmDDM1-1* e *ZmDDM1-2*, (*Zea mays*, números de acesso no ChromDB: CHR106 e no *GenBank*: NP_001105087.1), duas proteínas de arroz, *OsDDM1-1* e *OsDDM1-2* (*Oryza sativa*, números de acesso no *GenBank*: BAF34942.1

e BAF34945.1, respectivamente), duas proteínas hipotéticas de sorgo, *SbDDM1-1* e *SbDDM1-2* (*Sorghum bicolor*, sequências de proteínas geradas pela sobreposição de vários acessos, levando a formação de dois “clusters”).

Utilizando a proteína *AtDDM1* como referência (“*query*”), as sequências das proteínas obtidas dos membros da família Poaceae foram alinhadas pelo algoritmo CLUSTAL W (THOMPSON et al., 1994), cujo programa é integrante do software Bioedit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999) (acesso do software pelo website: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Os domínios conservados de cada proteína foram caracterizados, isolados e reagrupados formando uma “nova” sequência para cada proteína. Essas sequências (agora contendo apenas os domínios conservados das proteínas) foram novamente alinhadas e a matriz de alinhamento das regiões conservadas foi importada para o programa MEGA4 versão 4.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis - TAMURA et al., 2007) para análise filogenética (Tabela 4).

Analisou-se a matriz de identidade entre as proteínas selecionadas, cuja análise estima a convergência evolutiva entre os domínios conservados das proteínas DDM1 obtidas (Figura 25). Para a construção da árvore filogenética e comparação evolutiva das sequências, foi utilizado o método de inferência “Neighbor-joining”, o qual teve o grau de confiabilidade testado pelo teste de *bootstrap*, cujo valor estabelecido foi equivalente a 1000 (FELSENSTEIN, 1985).

Tabela 4 - Matriz de Identidade (%) entre as sequências de aminoácidos referente aos domínios conservados das proteínas DDM1 de espécies Poaceae e *At*DDM1

	<i>At</i>	<i>Aa</i>	<i>Os</i> -1	<i>Os</i> -2	<i>Sb</i> -1	<i>Zm</i> -1	<i>Sb</i> -2	<i>Zm</i> -2	<i>Ss</i>
<i>At</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aa</i>	97.0	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Os</i> -1	62.6	62.7	-	-	-	-	-	-	-
<i>Os</i> -2	62.6	62.7	96.5	-	-	-	-	-	-
<i>Sb</i> -1	61.1	61.5	83.3	83.3	-	-	-	-	-
<i>Zm</i> -1	60.0	60.6	82.8	82.4	94.2	-	-	-	-
<i>Sb</i> -2	61.7	62.0	83.5	83.8	84.9	83.8	-	-	-
<i>Zm</i> -2	61.5	62.0	81.3	81.5	82.8	81.9	91.4	-	-
<i>Ss</i>	62.4	62.8	84.4	84.5	94.3	91.3	89.5	86.4	-

* As siglas presentes na tabela representam a espécies: *At*, *A. thaliana*; *Aa*, *A. arenosa*; *Os*, *Oryza sativa*; *Zm*, *Zea mays*; *Sb*, *Sorghum bicolor*; *Ss*, *Saccharum* spp.

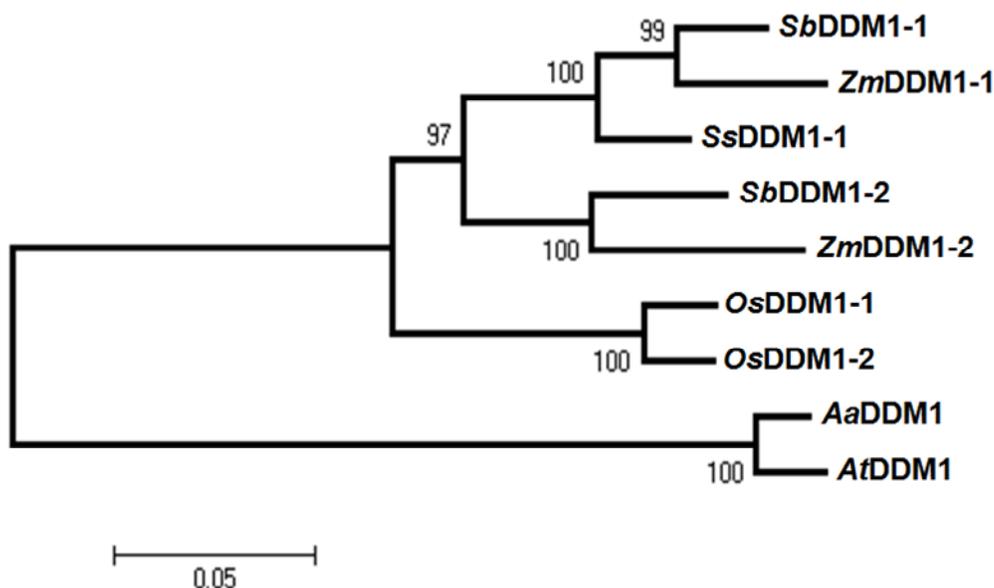


Figura 25 - Árvore obtida pelo método de inferência "Neighbor-joining" dos aminoácidos dos domínios conservados entre as espécies da Família Poaceae e de *A. thaliana*. Números indicam as porcentagens de bootstrap. *At*, *A. thaliana*; *Aa*, *A. arenosa*; *Os*, *Oryza sativa*; *Zm*, *Zea mays*; *Sb*, *Sorghum bicolor*; *Ss*, *Saccharum* spp.

Foi observado que sorgo, milho e cana-de-açúcar se localizam num clado separado, porém próximo, do clado no qual as proteínas de arroz se encontram. *A. thaliana* e *A. arenosa*, por serem espécies pertencentes a família das dicotiledôneas, estão num clado ainda mais distante (Figura 25). Apesar das proteínas *At*DDM1 e *Ss*DDM1 serem evolutivamente distantes, possuem 62,4% de identidade dos

aminoácidos (em seus domínios conservados), mostrando que as proteínas são altamente conservadas (Tabela 4).

Em virtude dos resultados de filogenia obtidos, associado ao fato da sequência do cDNA em cana-de-açúcar não estar completa e, principalmente pela grande quantidade de estudos com a proteína DDM1 de *Arabidopsis* (VONGS et al., 1993; JEDDELOH et al., 1998, 1999; HIROCHIKA et al., 2000; BRZESKI et al., 2003; LIPPMAN et al., 2003; SAZE et al., 2008), optou-se por utilizar a região codificante do gene de *Ddm1* de *A. thaliana* (cDNA) para a realização da construção pEP10 objetivando a transformação genética de cana-de-açúcar.

4.4 Transformação genética de Cana-de-Açúcar

O método de biolística empregado na co-transformação genética das variedades RB835486 e RB835089 com os plasmídeos pHA9 e pEP10 proporcionou um total de 34 plantas transgênicas contendo os genes *neo* e *AtDdm1*. Destas 34 plantas transgênicas, 24 foram obtidas a partir de calos embriogênicos (Tabela 5), enquanto 10 plantas foram regeneradas a partir de discos foliares (Tabela 6).

Dos 402 calos embriogênicos (com aproximadamente 2mm³ de dimensão) bombardeados para a variedade RB835089 foram regeneradas em meio seletivo (30mg.L⁻¹ de geneticina) 24 plantas, sendo 23 confirmadas, por PCR, para o gene *neo*. Por sua vez, a presença do gene *AtDdm1* foi confirmada, por PCR, em 8 das 23 plantas transgênicas analisadas que continham o gene *neo*. Para a variedade RB835486, dos 379 calos embriogênicos bombardeados foram obtidas 55 plantas tolerantes a geneticina, das quais 52 possuíam de fato o gene *neo*. Dessas 52 plantas transgênicas confirmadas por PCR para o gene *neo*, 16 plantas também tiveram a presença do gene *AtDdm1* confirmada.

A eficiência total de transformação para calos (Tabela 5), representada pela relação entre o número de plantas regeneradas confirmadas por PCR para ambos os genes (*neo* e *AtDdm1*) dividido pelo número total de calos bombardeados, foi de 2% para a variedade RB835089 e de 4,2% para a variedade RB835486. Esses resultados obtidos foram ligeiramente superiores aos resultados apresentados por Melotto-Passarin (2009), cujos valores médios da transformação por biolística de calos

embriogênicos foram de 0,9 e 1,12% para a variedade RB835089. Barbosa (2010), na co-transformação de calos embriogênicos, da variedade RB835486, com os genes *neo* e *comt(AS)*, conseguiu plantas transgênicas apenas para o gene *neo*. Li, Pan e Xu (2003) obtiveram 1,22% de eficiência de transformação em linhagens de cana-de-açúcar para os genes *LEAFY* e *neo*. Por outro lado, Arvinth et al. (2010) atingiram 10% de eficiência de transformação para os genes *cry1Ab* e *bar*, entretanto, os dois genes estavam presentes na mesma construção.

Tabela 5 - Resultado da co-transformação de calos embriogênicos das variedades RB835486 e RB835089 de cana-de-açúcar pelo método da biolística com os plasmídeos pHA9 e pEP10, contendo os genes *neo* e *AtDdm1*, respectivamente

Variedade	Tecido alvo	Placas Bombardeadas	Total de Explantes Bombardeados	Plantas Tolerantes a Geneticina	Plantas PCR (+) <i>neo</i>	Plantas PCR (+) <i>neo/AtDdm1</i>
RB835089	Calos	6	402	24	23	8
RB835486	Calos	6	379	55	52	16
Total		12	781	79	75	24

Variedade	Tecido alvo	Eficiência de Transformação (%) ^a	Eficiência de Co-transformação (%) ^b	% Escapes ^c
RB835089	Calos	2,0	34,8	4,2
RB835486	Calos	4,2	30,8	5,4
Média Ponderada ^d		3,1	32,8	4,6

^a A eficiência de transformações representa o total de plantas PCR (+) para os genes *neo/AtDdm1* dividido pelo total de explantes bombardeados.

^b A eficiência de co-transformação é a relação entre o total de plantas PCR (+) para os genes *neo/AtDdm1* dividido pelo total de plantas PCR (+) para o gene *neo*.

^c A porcentagem de escapes representa a diferença do número de plantas tolerantes a geneticina e o número de plantas PCR(+) para o gene *neo* dividido pelo número de plantas tolerantes a geneticina.

^d A média ponderada é calculada pela média geométrica dos valores de porcentagem obtidos em relação ao número de placas bombardeadas

Falco et al. (2000) registrou 133 plantas resistentes a geneticina (gene *neo*) e ao herbicida glufosinato de amônio (gene *bar*) em 132 placas de calos embriogênicos bombardeados. Esse resultado compara-se ao apresentado em calos da variedade

RB835089, que foi de 8 plantas transformadas em 6 placas bombardeadas. Já para a variedade RB835486, o número de plantas confirmadas para os genes *neo* e *AtDdm1* nas 6 placas bombardeadas mostrou-se superior, com 16 regeneradas. Entretanto, a comparação dos resultados baseando-se apenas no número de placas pode levar a falsas interpretações, pois pode haver variação de peso e/ou número de calos bombardeados por placa.

Em relação a transformação genética dos discos foliares (Tabela 6), dos 173 discos bombardeados para a variedade RB835089 foram obtidas 9 plantas regeneradas em meio seletivo (30mg.L^{-1} de geneticina), sendo todas confirmadas, por PCR, para o gene *neo*. Por sua vez, a presença do gene *AtDdm1* foi confirmada, por PCR, em 3 das 9 plantas transgênicas que continham o gene *neo*. Para a variedade RB835486, dos 125 discos foliares que sofreram disparos foram obtidas 23 plantas tolerantes a geneticina, das quais 22 possuíam de fato o gene *neo*. Dessas 22 plantas transgênicas confirmadas para o gene *neo*, 7 plantas também tiveram a presença do gene *AtDdm1* confirmada.

Tabela 6 - Resultado da co-transformação de discos foliares das variedades RB835486 e RB835089 de cana-de-açúcar pelo método da biolística com os plasmídeos pHA9 e pEP10, contendo os genes *neo* e *AtDdm1*, respectivamente

Variedade	Tecido alvo	Placas Bombardeadas	Explantos Bombardeados	Plantas Tolerantes a Geneticina	Plantas PCR (+) <i>neo</i>	Plantas PCR (+) <i>neo/AtDdm1</i>
RB835089	Discos	15	173	9	9	3
RB835486	Discos	12	125	23	22	7
Total		27	298	32	30	10

Variedade	Tecido alvo	Eficiência de Transformação (%) ^a	Eficiência de Co-transformação (%) ^b	% Escapes ^c
RB835089	Discos	1,7	33,3	0
RB835486	Discos	5,6	31,8	4,3
Média Ponderada ^d		3,4	32,6	1,9

^aA eficiência de transformações representa o total de plantas PCR (+) para os genes *neo/AtDdm1* dividido pelo total de explantes bombardeados.

^bA eficiência de co-transformação é a relação entre o total de plantas PCR (+) para os genes *neo/AtDdm1* dividido pelo total de plantas PCR (+) para o gene *neo*.

^cA porcentagem de escapes representa a diferença do número de plantas tolerantes a geneticina e o número de plantas PCR(+) para o gene *neo* dividido pelo número de plantas tolerantes a geneticina.

^dA média ponderada é calculada pela média geométrica dos valores de porcentagem obtidos em relação ao número de placas bombardeadas

A eficiência total de transformação em discos foliares (Tabela 2), representada pela relação entre o número de plantas regeneradas confirmadas por PCR para ambos os genes (*neo* e *AtDdm1*) dividido pelo número total de discos bombardeados, foi de 1,7% para a variedade RB835089 e de 5,6% para a variedade RB835486. Esses resultados assemelham-se aos valores de eficiência obtidos por Jesus (2010) e Barbosa (2010) para discos foliares da variedade RB835486, os quais foram respectivamente, 2,85% e 9,9% (esse último, média entre os valores de 4,4% e 15,5% obtidos em diferentes experimentos de transformação).

Em relação à eficiência de co-transformação, a qual se refere ao número de plantas confirmadas por PCR para o gene *neo* que de fato também receberam o gene *AtDdm1*, obteve-se para calos embriogênicos a eficiência de 34,8% para a variedade

RB835089 e de 30,8% para a variedade RB835486. Enquanto que para discos, os valores de eficiência de co-transformação foram de 33,3% para a variedade RB835089 e de 31,8% para a variedade RB835486. Os resultados obtidos de eficiência de co-transformação foram praticamente iguais independente da variedade e do explante utilizado na transformação.

Falco et al. (2000) mostraram em calos bombardeados uma eficiência de co-transformação de 95% para os genes *neo* e *bar*. Bower et al. (1996) relataram que 67 a 79% das plantas tolerantes a geneticina também apresentavam a presença do gene *luc* (luciferase). Barbosa (2010), usando os genes *neo* e *comt(AS)* na transformação de discos foliares da variedade RB835486 em dois experimentos realizados, obteve eficiências de co-transformação de 12% e 38,9%. Ainda para discos da mesma variedade, Jesus (2010) conseguiu para os genes *neo* e AQUA_SI uma eficiência de co-transformação equivalente a 31%. Esses dois últimos resultados apresentaram similaridade em relação aos dados obtidos.

Melotto-Passarin (2009) apresentou que a eficiência de co-transformação com os genes *neo* (vetor pHA9 – 5743pb) e *AtBI-1* (vetor pDM8 – 4585pb) foi de 83%, enquanto que essa eficiência para os genes *neo* (vetor pHA9 – 5743pb) e *AtBI-1* (vetor pDM9 – 5764pb) diminuiu para 71%. Este resultado pode explicar a razão pela qual a eficiência de co-transformação para os genes *neo* (vetor pHA9 – 5743pb) e *AtDdm1* (vetor pEP10 – 7632pb) atingiu valores médios de 34%. A explicação pode estar no tamanho dos vetores e na quantidade de DNA aplicada no preparo das partículas utilizados durante a co-transformação de calos e discos foliares. A relação entre o peso molecular e o tamanho do plasmídeo não foram levados em consideração durante o preparo das partículas, ou seja, cerca de 5µg de DNA de cada plasmídeo foi utilizado no preparo, no entanto há uma diferença no tamanho dos vetores empregados nos bombardeamentos. O plasmídeo pHA9 possui 5743pb, enquanto o plasmídeo pEP10 contém 7632pb, representando um valor 33% maior, o que na prática conferiu um número menor de cópias do vetor pEP10 ao preparo de partículas para co-transformação quando comparado ao vetor pHA9. Segundo Altpeter et al. (2005), quanto maior a tamanho do vetor utilizado na transformação por biolística maior a

dificuldade de obter transformantes estáveis, isto é, a incorporação do transgene no genoma vegetal é dificultada.

A porcentagem de escapes, isto é, a quantidade de plantas regeneradas em meio seletivo contendo 30mg.L^{-1} de geneticina, mas que não foram confirmadas por PCR para o gene *neo*, foi para a variedade RB835089 de 4,2% para calos e de zero para discos. Enquanto para a variedade RB835486, a porcentagem de escapes foi de 5,4% para calos e 4,3% a partir de discos. Esses resultados assemelham-se aos valores obtidos por Falco et al. (2000) e Jesus (2010). Falco et al. (2000) mostrou que cerca de 3% das plantas regeneradas a partir de calos em meio seletivo contendo geneticina eram escapes. Já Jesus (2010), na seleção de discos em meio seletivo contendo 30mg.L^{-1} , garantiu a ausência de escapes. No entanto, os valores recentes obtidos por Melotto-Passarin (2009) mostraram que as porcentagens de escapes para dois experimentos envolvendo a transformação de calos por biolística foram de 14% e 32,3% para o antibiótico geneticina, similarmente ao que foi obtido por Barbosa (2010) na mesma seleção, porém com discos foliares.

Nesse contexto, o valor médio de escapes para calos e discos que foi de 2,8% representou um valor relativamente baixo, indicando que o método de seleção realizado com o antibiótico geneticina para calos embriogênicos e discos foliares das variedades RB835089 e RB835486 foi eficiente, confirmando os resultados de Birch et al. (1996), Arencibia et al. (1998), Falco et al. (2000) e Xu et al. (2008).

A Figura 26 representa um esquema geral das etapas do processo de transformação genética pelo método da biolística realizado pelo acelerador de micropartículas (Figura 26A) para calos embriogênicos (Figura 26B, D e F) e discos foliares (Figura 26C, E e G) cana-de-açúcar. A transformação foi realizada pelo método de co-transformação, utilizando os vetores pHA9 (gene *neo*) e pEP10 (gene *AtDdm1*), sendo os explantes bombardeados selecionadas em 30mg.L^{-1} de geneticina durante 3 a 4 ciclos de seleção (repiques realizados a cada 3 semanas) até serem aclimatadas na sala de cultura (Figura 26H) e depois transferidas para casa-de-vegetação (Figura 26I).

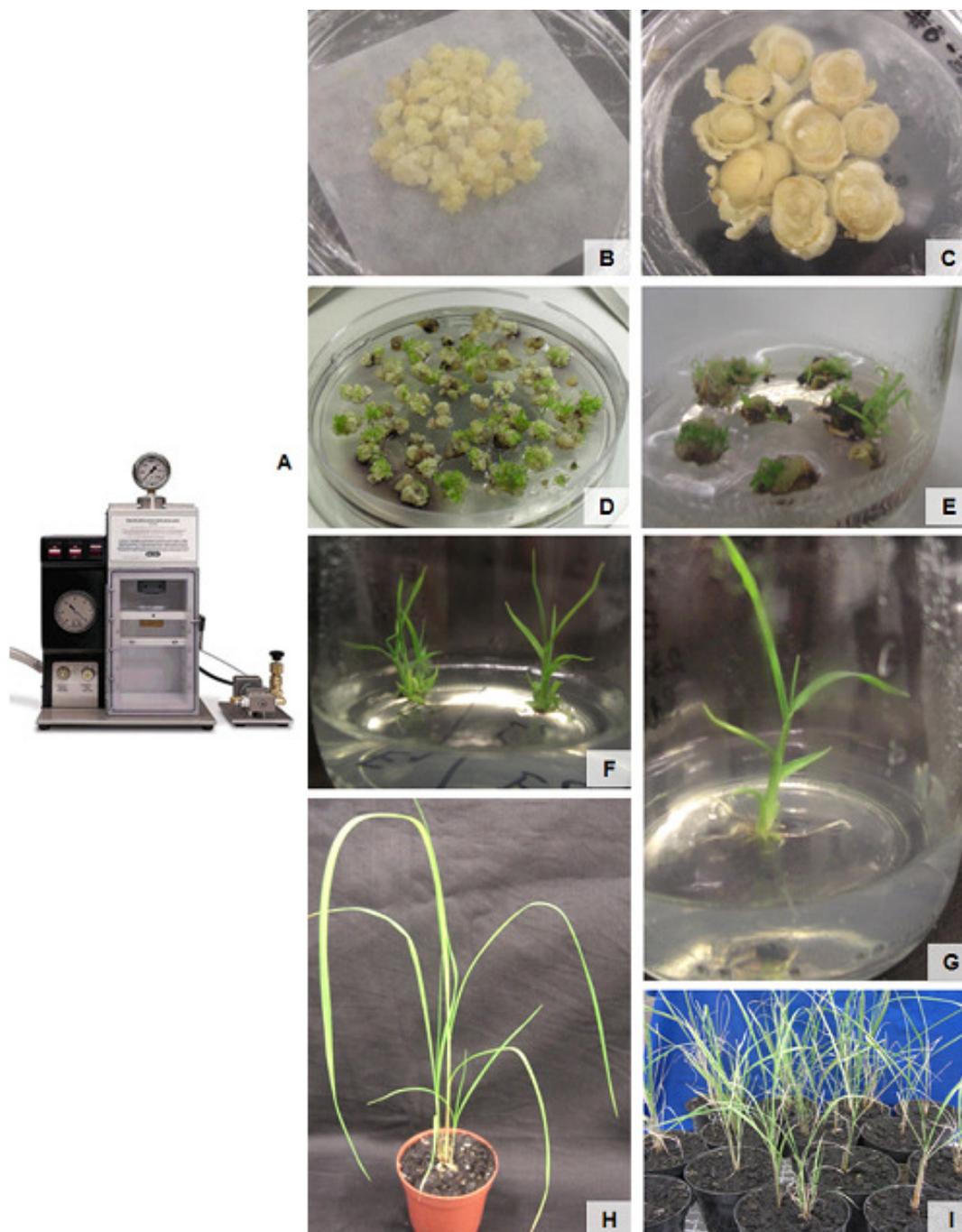


Figura 26 - Esquema representativo do processo de transformação genética de cana-de-açúcar por biolística, a partir de calos embriogênicos e discos foliares. A: Acelerador de micropartículas modelo PDS-1000/He *Biolistic® Delivery System* (BIO-RAD). B: Calos embriogênicos em meio osmótico prontos para serem bombardeados. C: Discos de palmito em meio MS3cAC com 250mg.L⁻¹ de cefotaxima, momentos antes do disparo. D e E: Seleção de calos (D) e discos (E) em meio de regeneração contendo 30mg.L⁻¹ de geneticina. F e G: Regeneração de plantas a partir de calos (F) e discos (G) em meio seletivo. H e I: Plantas transgênicas em aclimação na sala de cultura (H) e em casa de vegetação (I)

O método de transformação por biolística mostrou-se rápido e prático, mas que requer cuidados adicionais no preparo de partículas e precipitação destas nas membranas carreadoras, evitando a formação de aglomerados de partículas, pois podem ocasionar severos danos físicos aos tecidos alvos, conforme reforçado por Melotto-Passarin (2009). Além disso, a seleção rigorosa e cuidadosa dos explantes alvos na transformação foi determinante para as eficiências de transformação obtidas. Calos embriogênicos nos estágios mais friáveis, altamente embriogênicos e com coloração amarelo-claro, possuem proliferação celular rápida e citoplasma mais denso (GUIDERDONI et al., 1988; FALCO et al., 1996), condições que podem, respectivamente, favorecer a integração do DNA no genoma celular e o direcionamento do DNA bombardeado ao núcleo. Discos foliares, pré-induzidos por 15 a 21 dias, apresentando calos com características morfológicas de rápida proliferação celular distribuídos em toda superfície dos discos, associada a seleção em genética na seleção dos discos foliares, promoveu melhor desenvolvimento inicial das brotações, favorecendo a regeneração das plantas em meio seletivo, além de manter baixo o número de escapes.

O tempo médio para obtenção de plantas transgênicas de cana-de-açúcar por biolística utilizando calos embriogênicos variou de 5 a 6 meses, enquanto o período médio para obtenção de plantas transgênicas empregando mesma metodologia de transformação, mas utilizando discos foliares foi de 3 a 4 meses.

O uso de discos foliares (LAKSHMANAN et al., 2006) associado ao pré-tratamento com 2,4-D (FRANKLIN et al., 2006) parece ser uma ferramenta promissora para transformação genética de cana-de-açúcar, pois permite a obtenção de plantas de maneira mais rápida quanto comparada aos calos, além de ser um método que minimizando o período das culturas *in vitro* no estágio de calos, pois o longo período *in vitro* e, principalmente, no estágio de calos são fatores que estão fortemente relacionados ao fenômeno da variação somaclonal (HIROCHIKA et al., 1993, 1996, 2000; ZUCCHI et al., 2002; LAKSHMANAN et al., 2006).

4.4.1 Confirmação das plantas transgênicas por PCR

As plantas regeneradas em meio seletivo antes de serem confirmadas como eventos de transformação foram chamadas de plantas candidatas ou transgênicas putativas. O DNA das 111 plantas tolerantes a geneticina foi extraído e quantificado antes de ser submetido às reações de PCR. Inicialmente, analisou-se a integração do gene *neo*, presente no plasmídeo pHA9.

Conforme mostrado em detalhes na Tabela 5 e 6 (item 4.1), das 111 plantas candidatas analisadas para o gene *neo*, 105 plantas foram confirmadas quanto a integração do gene *neo* no genoma vegetal. A Figura 27 representa um dos géis de agarose (1,2%) contendo 23 plantas confirmadas para o gene *neo* dentre as 105 confirmadas pela amplificação do fragmento de 437pb. Como controle negativo das reações utilizou-se a água ou branco (mix da reação apenas) e plantas de cana-de-açúcar não transformadas ou selvagens (WT). Para o controle positivo, aplicou-se o plasmídeo correspondente ao gene a ser detectado, isto é, o plasmídeo pHA9 referente ao gene *neo*.

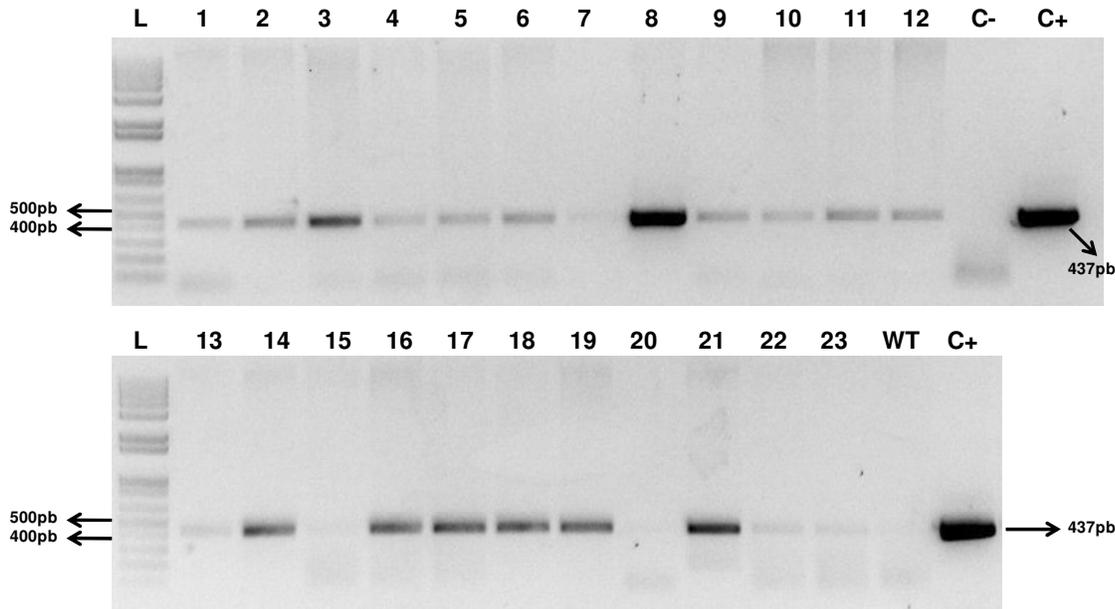


Figura 27 - Fotografia obtida de um gel de agarose (1,2%) referente ao resultado das reações de PCR realizadas para análise da integração do gene *neo* nas plantas candidatas. L: 1Kb DNA ladder plus; amostras 1 a 6: plantas putativas regeneradas a partir de calos da variedade RB835089; amostras 7 a 9: plantas putativas regeneradas a partir de discos foliares da variedade RB835089; amostras 10 a 18: plantas candidatas obtidas de calos da variedade RB835486; amostras 19 a 23: plantas candidatas obtidas de discos da variedade RB835486; C-: controle negativo da reação; C+: controle positivo (plasmídeo pHA9); WT: controle negativo representado por planta não transformada (ou selvagem)

Para análise da integração do gene *AtDdm1*, foram realizadas as reações de PCR para as 105 plantas anteriormente confirmadas para o gene *neo*. Segundo informações contidas na Tabela 1, das 105 plantas confirmadas por PCR para o gene *neo*, 34 também continham o gene *AtDdm1* integrado no genoma. Assim como adotado para a amplificação do gene *neo*, os primers para o gene *AtDdm1* foram desenhados de modo a amplificarem unicamente o transgene inserido no genoma. O fragmento amplificado foi de 605pb, tendo o primer *Forward* (senso) anelando na região do íntron do promotor *Ubi-1* e o primer *Reverse* (antissenso) anelamento na sequência do gene *AtDdm1*. A Figura 28 representa um gel de agarose (1,2%) como o resultado da reação de PCR para 16 plantas co-transformadas com o gene *neo* e *AtDdm1*. Os controles negativos das reações foram a água (mix da reação de PCR apenas) e planta de cana-de-açúcar não transformada ou selvagem (WT), enquanto que o controle positivo refere-se ao plasmídeo pEP10, que contém o gene *AtDdm1*.



Figura 28 – Fotografia obtida de um gel de agarose (1,2%) referente ao resultado das reações de PCR realizadas para análise da integração do gene *AtDdm1* nas plantas anteriormente confirmadas para o gene *neo*. L: 1Kb DNA ladder plus; amostras 1 a 4: plantas putativas obtidas de calos da variedade RB835089; amostras 5 e 6: plantas putativas obtidas de discos foliares da variedade RB835089; amostras 7 a 13: plantas candidatas obtidas de calos da variedade RB835486; amostras 14 a 16: plantas candidatas obtidas de discos da variedade RB835486; C-: controle negativo da reação; C+: controle positivo (plasmídeo pEP10); WT: controle negativo das amostras, planta não transformada ou selvagem

Após a confirmação da integração dos transgenes contendo o gene *neo* e *AtDdm1* no genoma das variedades RB835089 e RB835486 de cana-de-açúcar, as 34 plantas transgênicas foram transferidas para meio MSAC fresco e sem adição de agente seletivo para estimular o perfilhamento *in vitro* das plântulas. Das 34 plantas transgênicas para ambos os genes, cerca de 10 plantas já possuíam cerca de 2 a 3 perfilhos cada e, desta forma, um dos perfilhos de cada evento de transformação foram coletados e transferidos do ambiente *in vitro* para aclimação na própria sala de cultura. Antes da transferência das plantas para substrato, as raízes das plantas foram lavadas em água corrente para retirada do excesso de meio de cultura presente. As plantas em aclimação foram cobertas por um plástico transparente para manutenção da umidade relativa. Os vasos com as plantas em aclimação foram mantidos na sala de crescimento com fotoperíodo de 16h (intensidade luminosa de $30\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e sob temperatura de $27\pm 1^\circ\text{C}$). A irrigação foi realizada por capilaridade, ou seja, os vasos foram colocados por alguns segundos em uma bandeja contendo água para ascensão desta por capilaridade. Após duas semanas em aclimação, as plântulas de cana-de-açúcar foram finalmente transferidas para vasos maiores na casa de vegetação.

4.4.2 Confirmação da integração do gene *AtDdm1* via sequenciamento

Após o sequenciamento, as sequências de DNA das 4 plantas transgênicas, referentes ao fragmento amplificado por PCR para o gene *AtDdm1*, foram analisadas pela ferramenta BLAST presente no banco de dados do NCBI (*Genbank*).

As sequências geradas pelo banco de dados do NCBI mostraram que as sequências de DNA analisadas, pertencentes as plantas transgênicas (“query”), referem-se ao cDNA do gene *Ddm1* de Arabidopsis (acesso NM_126073), o qual foi utilizado na construção do vetor pEP10 (Figura 29). O resultado também apresenta que o gene *AtDdm1* presente no banco de dados apresentou 100% de identidade com os fragmentos de DNA sequenciado. Além disso, o indicador de confiabilidade “*E-value*”, que indica a probabilidade desse fragmento amplificado das plantas transgênicas não ser o gene *Ddm1* de Arabidopsis apresentou o valor “zero” (dado não mostrado), confirmando que a banda amplificada das plantas transgênicas realmente é de fato o gene referente a *AtDdm1* inserido via transformação genética.

```
>ref|NM_126073.2| Arabidopsis thaliana CHR1 (CHROMATIN REMODELING 1); ATPase/ helicase
(CHR1) mRNA, complete cds. Length=2598
GENE ID: 836808 CHR1 | CHR1 (CHROMATIN REMODELING 1); ATPase/ helicase
[Arabidopsis thaliana] (10 or fewer PubMed links)
Score = 937 bits (507), Expect = 0.0
Identities = 507/507 (100%), Gaps = 0/507 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 99  CGATGGTTAGTCTGCGCTCCAGAAAAGTTAATCCGGCTTCGGAATGGTCAGCGACGGGA 158
Sbjct 98  CGATGGTTAGTCTGCGCTCCAGAAAAGTTAATCCGGCTTCGGAATGGTCAGCGACGGGA 157
Query 159 AAACGGAGAAAGATGCGTCTGGTATTACCCACTTCTGTTCTCAACGAGGAGAAAAC 218
Sbjct 158 AAACGGAGAAAGATGCGTCTGGTATTACCCACTTCTGTTCTCAACGAGGAGAAAAC 217
Query 219 GTGAGGAGAAAAGTGTACTGTTGTAGAGGAAGAGATACTTCTAGCCAAAATGGAGATT 278
Sbjct 218 GTGAGGAGAAAAGTGTACTGTTGTAGAGGAAGAGATACTTCTAGCCAAAATGGAGATT 277
Query 279 CTTCCTTATTTCTGAAGCCATGGCTCAGGAGGAAGAGCAGCTGCTCAAACCTTCGGGAAG 338
Sbjct 278 CTTCCTTATTTCTGAAGCCATGGCTCAGGAGGAAGAGCAGCTGCTCAAACCTTCGGGAAG 337
Query 339 ATGAAGAGAAAGCTAACAAATGCTGGATCTGCTGTTGCTCCTAATCTGAATGAAACTCAGT 398
Sbjct 338 ATGAAGAGAAAGCTAACAAATGCTGGATCTGCTGTTGCTCCTAATCTGAATGAAACTCAGT 397
Query 399 TTACTAACTTGATGAGCTCTTGACGCAAACTCAGCTCTACTCTGAGTTTCTCCTTGAGA 458
Sbjct 398 TTACTAACTTGATGAGCTCTTGACGCAAACTCAGCTCTACTCTGAGTTTCTCCTTGAGA 457
Query 459 AAATGGAGGATATCACAATTAATGGGATAGAAAGTGAGAGCCAAAAGCTGAGCCCGAGA 518
Sbjct 458 AAATGGAGGATATCACAATTAATGGGATAGAAAGTGAGAGCCAAAAGCTGAGCCCGAGA 517
Query 519 AGACTGGTCGTTGACGCAAAAAGAGGCTGCTTCTCAGTACAACAATACTAAGGCTAAGA 578
Sbjct 518 AGACTGGTCGTTGACGCAAAAAGAGGCTGCTTCTCAGTACAACAATACTAAGGCTAAGA 577
Query 579 GAGCGGTTGCTGCTATGATTTCAAGAT 605
Sbjct 578 GAGCGGTTGCTGCTATGATTTCAAGAT 604
```

Figura 29 - Resultado obtido através da ferramenta BLAST no banco de dados do NCBI (*GenBank*) após análise da sequência do produto de PCR gerado de 4 plantas transgênicas avaliadas quanto a presença do gene *AtDdm1*. A seta aponta a identidade de 100% das bases entre a sequência do gene *Ddm1* de Arabidopsis presente no banco de dados e a sequência analisada (“query”)

4.4.3 Normalização e Análise de Expressão do Gene *AtDdm1*

No intuito de verificar a expressão do transgene *AtDdm1* nas plantas transgênicas que apresentaram PCR positivo para os genes *neo* e *AtDdm1*, 14 plantas dentre essas 34 transgênicas obtidas foram selecionadas de maneira representativa, a qual contemplou 6 plantas transgênicas da variedade RB835089 (sendo 4 originadas de calos e 2 de discos) e 8 plantas transgênicas da variedade RB835486 (sendo 5 originadas de calos e 3 de discos), para análise de expressão por RT-PCR semi-quantitativo.

O RNA total extraído das 14 plantas transgênicas selecionadas e da planta controle não transformada foi analisado em gel de agarose 1,0% (TAE 1X, 5V.cm⁻¹) e indicou integridade e boa qualidade do RNA obtido (Figura 30).

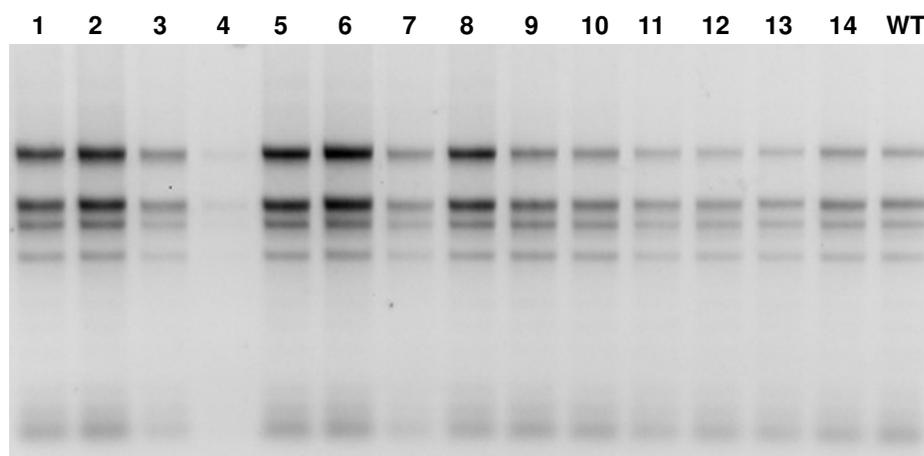


Figura 30 - Fotografia obtida do gel de agarose (1,0%) corado com brometo de etídeo referente ao RNA total extraído, pelo método do Trizol, de 14 plantas transgênicas para o gene *neo* e *AtDdm1* (amostras 1 a 14) e 1 planta controle não transformada (WT)

O RNA total, após o tratamento com DNase I, foi submetido a reação de PCR (controle negativo da reação), para verificar se o RNA tratado está livre de DNA genômico e garantir que os resultados de expressão são de fato resultantes apenas das amostras de cDNA e não de possíveis contaminantes. O controle negativo realizado com o gene *SsGAPDH* mostrou não haver amplificações em nenhuma das 15 amostras de RNA tratado, sugerindo que o RNA após o tratamento com DNase I estava livre de contaminações com o DNA genômico (Figura 30-(1)).

Antes da análise de expressão para o gene *AtDdm1*, foi realizada a normalização por PCR, das 15 amostras de cDNA sintetizadas, para o gene *gliceraldeído 3-fosfato*

desidrogenase (GAPDH). Segundo Iskandar et al. (2004), o gene *GAPDH*, dentre outros genes controles utilizados como β -actina e subunidades ribossomais, foi o que obteve maior uniformidade na expressão do mRNA em diferentes tecidos de cana-de-açúcar. O resultado final da normalização dos cDNAs com o gene controle *GAPDH*, representado pela mesma intensidade das bandas entre as amostras, visualizado em gel de agarose 2% (fragmento amplificado de 180pb), pode ser observado na Figura 30-(2).

Por meio da normalização, estabeleceu-se a concentração (diluição) de cDNA a ser empregado nas reações de PCR para a análise de expressão do gene de interesse *AtDdm1*. A reação de PCR para análise de expressão do gene *AtDdm1* (Figura 30-(3)), inserido via transformação genética, foi realizada com primers altamente específicos à sequência do transgene, no intuito de evitar anelamento inespecífico, principalmente, com o gene *Ddm1* endógeno.

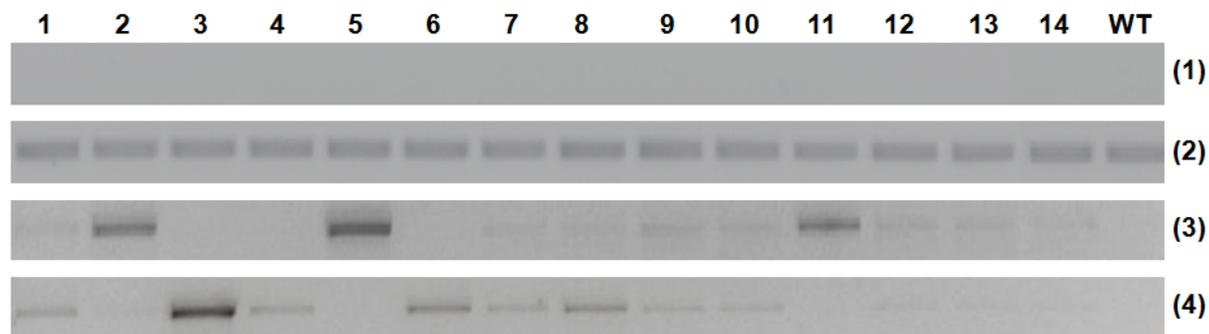


Figura 30 - Análise de expressão do gene *AtDdm1* por RT-PCR (3) e a atividade do retrotransposon TE010 (4) nas plantas transgênicas, confirmadas para os genes *neo* e *AtDdm1*. Gel de agarose 1,5%. Amostras 1 a 6: plantas obtidas da variedade RB835089 a partir de calos (1 a 4) e de discos (5 a 6); amostras 7 a 14: plantas da variedade RB835486 obtidas a partir de calos (7 a 11) e de discos (12 a 14); WT: controle negativo, planta não transformada (selvagem). (1) RT-: controle negativo, que representa a reação de PCR sem ter ocorrido RT. (2) Normalização com o gene *SsGAPDH* (2)

De acordo com Figura 30-(3), verificou-se que 11 das 14 plantas transgênicas analisadas apresentaram expressão, embora apenas 3 delas apresentassem de fato altos níveis de expressão, são elas as plantas número 2, 5 e 11. Além disso, a relação entre nível de expressão parece não estar relacionada ao tipo de explante utilizado e/ou a variedade adotada, pois independente se as plantas transgênicas foram regeneradas de discos ou de calos, para as variedades RB835089 e RB835486, não se encontrou

indícios de que a expressão em um determinado explante e/ou variedade tenha sido diferente do outro. O fato de apenas 3 plantas dentre as 14 analisadas (21,5%) apresentarem altos níveis de expressão pode estar relacionado à região de inserção do transgene no genoma vegetal, ao número de cópias inseridos e a integridade do transgene após a inserção.

Regiões centroméricas, intergênicas e de heterocromatina, por exemplo, por serem regiões onde a cromatina encontra-se altamente condensada apresentam baixa atividade gênica quando comparadas as regiões de eucromatina, onde a cromatina se encontra mais desespiralada, facilitando, assim, o acesso dos agentes reguladores da transcrição. Segundo Lakshmanan et al. (2006), a transformação genética via biolística é principal metodologia empregada na introdução de transgenes em cana-de-açúcar, no entanto, plantas transgênicas produzidas por este método mostram grande variação na expressão do transgene. Altpeter et al. (2005) relataram que o baixo número de cópias do transgene é requerido para altos níveis de expressão. Entretanto cada cassete de expressão deve estar intacto, isto é, não sofre rearranjos ou fragmentação anteriormente a integração. Kohli et al. (1999) mostraram que a presença de um ou mais cópias rearranjadas podem potencialmente levar ao silenciamento gênico, mesmo se outras cópias estão intactas ou funcionais.

Baseando-se no trabalho desenvolvido por Hirochika e colaboradores (2000), no qual estes pesquisadores mostraram que em plantas de *Arabidopsis* mutantes para o gene *ddm1*, os LTR retrotransposons *Tto1* e *Tar17* tornavam-se transcricionalmente e transposicionalmente ativos. Porém, quando essas plantas mutantes foram cruzadas com plantas normais de *Arabidopsis* para o gene *Ddm1* e retomaram a atividade funcional do gene *Ddm1*, os retroelementos foram silenciados, indicando que a função do gene *Ddm1* foi necessária para supressão dos retrotransposons *Tto1* e *Tar17*. Nesse contexto, decidiu-se analisar a expressão do LTR retrotransposon TE010 (DE ARAÚJO et al., 2005) para as plantas transgênicas contendo o gene *AtDdm1*, no intuito de verificar essa possível correlação entre expressão do gene *Ddm1* nas plantas transgênicas e silenciamento do retrotransposon, e vice-versa.

Após as reações de PCR, o resultado referente a amplificação do retroelemento TE010 foi analisada em gel de agarose 1% (TAE 1X, 5V.cm⁻¹). Constatou-se diferentes

níveis de expressão para esse elemento entre as plantas transgênicas e planta não transgênica (controle) (Figura 30-(4)).

Nas plantas transgênicas 3, 6 e 8, verificam-se níveis maiores expressão do TE010, enquanto que nas plantas 5, 11 e WT esse retrotransposon não teve a sua atividade detectada. Nas plantas 2, 7, 9, 10, 11, 12, 13 e 14, por sua vez, apresentaram um nível de expressão baixo para o TE010. Comparando-se esses resultados aos apresentados na Figura 30-(3), identifica-se uma correlação negativa entre expressão do gene *AtDdm1* e a expressão do retrotransposon TE010, isto é, nas plantas transgênicas 2, 5 e 11 com altos níveis de expressão para o gene *AtDdm1*, apresentaram baixíssimos níveis de expressão do TE010. Já nas plantas onde se detectou maior atividade do elemento de transposição (3, 6 e 8), a atividade do gene *AtDdm1* não foi detectada, possivelmente em virtude da expressão do transgene estar reprimida..

Esse resultado para o elemento TE010 confirma o indício levantado por Hirochika et al. (2000), que demonstraram que a função do gene *Ddm1* foi necessária para suprimir os LTR retrotransposons *Tar17* e *Tto1*. A não detecção do retroelemento TE010 na planta selvagem (WT) pode estar relacionada ao fato da planta não ter sido submetido ao bombardeamento e não estar em meio seletivo (ausência do antibiótico geneticina), situações que representam condições de estresse.

A proteína DDM1 parece ter função chave no controle de retrotransposição, pois mutantes *ddm1* foram essenciais para a mobilização de retrotransposons (TSUKAHARA et al., 2009). Proteínas que modificam a estrutura da cromatina são também envolvidas no silenciamento de elementos de transposição (SLOTKIN; MARTIENSSEN, 2007). Em *Arabidopsis*, a proteína DDM1 é especificamente requerida para o silenciamento dos elementos de transposição (LIPPMAN et al., 2004). Em mutantes *ddm1*, a ativação de ETs silenciados foi observada (HIROCHIKA et al., 2000; MIURA et al., 2001; SINGER et al., 2001). Adicionalmente, notou-se que os transcritos dos ETs são altamente elevados em mutantes *ddm1* (HUANG et al., 2004).

Diante disso, os resultados obtidos em cana-de-açúcar transgênica expressando o gene *AtDdm1* apontam mais um indício de que a o gene *Ddm1* é importante no silenciamento de LTR retrotransposons, como foi o caso do retroelemento *Copia-Ty1*

TE010, permitindo um maior suporte a futuros estudos envolvendo o silenciamento de elementos de transposição, principalmente em espécies como a cana-de-açúcar.

4.5 Análise da atividade dos LTR Retrotransposon em cana-de-açúcar

4.5.1 Análise da atividade dos LTR Retrotransposon em diferentes estágios do desenvolvimento *in vitro*

A análise da atividade dos quatro LTR Retrotransposons foi realizada para diferentes estágios do desenvolvimento *in vitro* da variedade RB835486, os quais foram representadas pelos discos foliares antes de serem introduzidos no meio de cultura MS3c (R₀), pelos calos durante 6 meses de subcultivo (R₁ a R₆), pelos calos na luz em início de regeneração (S₁), pelos calos na luz com a formação das primeiras brotações (S₂) e pelas plantas regeneradas *in vitro* (P), conforme ilustrado na Figura 31.

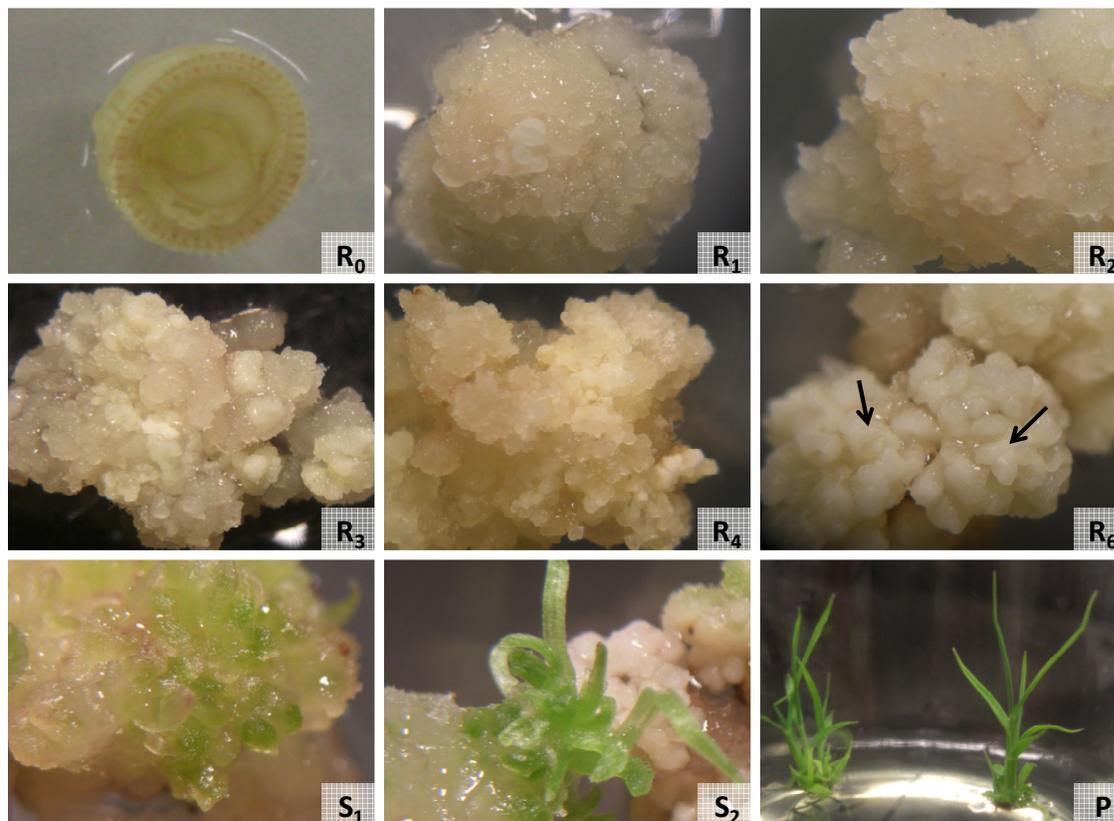


Figura 31 - Fases de desdiferenciação/diferenciação do desenvolvimento *in vitro* da variedade RB835486 de cana-de-açúcar. R₀: discos foliares antes de serem introduzidos no meio de cultura MS3c; R₁ a R₆: estágios de subcultivo de calos com 1 a 6 meses de idade, respectivamente; S₁: calos na luz em início de regeneração; S₂: calos na luz com a formação das primeiras brotações; P: plantas regeneradas *in vitro*. Setas indicam formação dos embriões somáticos.

4.5.1.1 Determinação do gene controle e normalização do cDNA

Anteriormente a análise de expressão dos LTR retrotransposons, testaram-se quatro genes controles na normalização do cDNA das amostras dos diferentes estágios do desenvolvimento *in vitro*. Os genes controles *GAPDH*, *β-actina*, *RPL35.4* e *UbiQ2* foram testados na normalização dos diferentes tecidos, uma vez que careciam estudos relacionados a análise de expressão concomitantemente em calos e em folhas de cana-de-açúcar.

O controle negativo da reação, realizado com os quatro genes controles, de fato mostrou que o RNA tratado com DNase I não permitiu a amplificação de qualquer fragmento, garantindo que o RNA tratado estava livre de DNA genômico (Figura 32).

Após as reações de normalização para os quatro genes controles, verificou-se que os genes *SsGAPDH* e *SsRPL35.4* foram os que apresentaram melhor uniformidade

de expressão entre as amostras de cDNA dos diferentes estágio de desenvolvimento *in vitro* (Figura 32 e dados não mostrados). O resultado obtido para o gene *GAPDH* confirma o que foi relatado por Iskandar et al. (2004), que mostraram que este gene foi o que obteve maior uniformidade de expressão entre os diferentes tecidos de cana-de-açúcar. Jesus (2010), para normalização de amostras de folhas cana-de-açúcar visando a análise de expressão gênica, utilizou com sucesso o gene *RPL35.4*. Por sua vez, Melotto-Passarin (2009) utilizou o gene da *β -actina* na normalização do cDNA de folhas de cana. No entanto o gene da *β -actina* não mostrou consistência e padronização entre os estágios de desenvolvimento analisados (dados não mostrados).

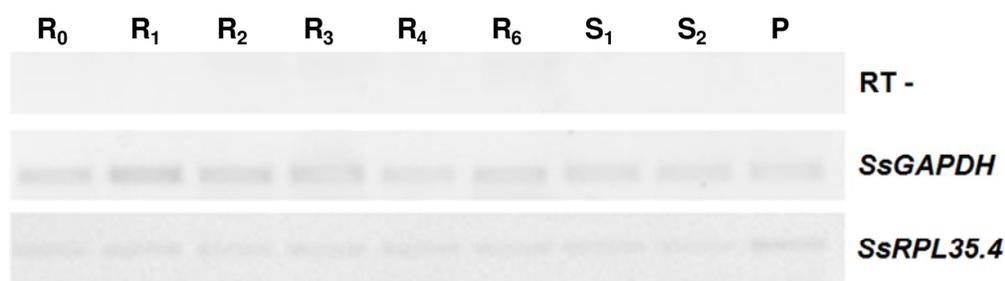


Figura 32 - Normalização dos cDNAs com genes controle GAPDH e RPI35.4. R₀: discos foliares antes de serem introduzidos no meio de cultura MS3c; R₁ a R₆: estágios de subcultivo referente a calos com 1 a 6 meses de idade, respectivamente; S₁: calos na luz em início de regeneração; S₂: calos na luz com a formação das primeiras brotações; P: plantas regeneradas *in vitro*. O controle negativo (RT-) representa amostras de PCR sem a enzima RT

De acordo com os resultados de normalização, constatou-se que os genes *GAPDH* e *RPL35.4* apresentaram distribuição uniforme ao longo das amostras (Figura 32), podendo ser utilizados com consistência como controles para a análise de expressão (atividade) dos retrotransposons. Já os genes *β -actina* e *UbiQ2*, por apresentarem variações de expressão entre as amostras em estudo, não foram utilizados como genes controle. Nas próximas normalizações, adotou-se apenas o gene *SsGAPDH* como gene controle.

4.5.1.2 Análise de expressão dos LTR Retrotransposons TE010, TE028, TE070 e TE053

Por meio da normalização com o gene *GAPDH* e *RPL35.4*, estabeleceu-se a diluição de cDNA a ser empregada nas reações de PCR para a análise de expressão

dos quatro LTR retrotransposons: TE010, TE028, TE070 e TE053. Inicialmente, optou-se pela reação de PCR para o elemento TE010, para otimização do número de ciclos. Após a reação de amplificação, analisou-se o resultado em gel de agarose 1% (TAE 1X, 5 V.cm⁻¹).

Constatou-se um diferente padrão de expressão diferente para retroelemento TE010 durante as distintas fases de cultura de tecidos (Figura 33). Interessantemente, foi observado alto nível de acúmulo de transcritos do TE010 na fase R₀. Entretanto, de acordo com de Araújo et al. (2005) esperava-se baixa expressão desse retroelemento nesse estágio. A expressão elevada do TE010 em R₀ pode ser devido ao fato de que os discos foliares coletados sofreram o processo de assepsia para introdução *in vitro*, o que pode ser sentido pelas células como sinal de estresse. Em outras palavras, o processo de assepsia rotineiramente utilizado para preparar explantes para introdução *in vitro*, pode “disparar” a atividade de retrotransposons em seu genoma. Nas amostras dos calos, para os subcultivos R₁ a R₄ (1^o ao 4^o mês de idade dos calos), foi observado altos níveis de expressão, sendo os calos dos subcultivos R₃ e R₄ superiores aos anteriormente coletados (estágios R₁ e R₂). Esse resultado está de acordo com outros trabalhos que mostram expressão acentuada dos LTR retrotransposons no estágio de calo (HIROCHIKA et al., 1996; ROSSI et al., 2001; DE ARAÚJO et al., 2005). Por outro lado, calos altamente embriogênicos, de característica nodular e compacta (R₆) mostraram uma redução acentuada na expressão do elemento TE010. Nos estágios seguintes de desenvolvimento (S₁ e S₂), a expressão do retroelemento manteve-se baixa e na fase de planta regenerada *in vitro*, não se detectou acúmulo de transcritos do retroelemento TE010.

Esses resultados sugerem que mudança do *status* de desdiferenciação para diferenciação que ocorre durante o desenvolvimento *in vitro* da cultura podem induzir ao silenciamento desse retrotransposon. Os estágios de maior desdiferenciação, representado basicamente para os estágios iniciais de calos (R₁ a R₄) tendem a seguir uma rota de diferenciação, levando a formação de estruturas mais bem organizadas, como pré-embriões (estágio R₆), seguindo para a formação (S₁) e desenvolvimento dos primórdios (S₂), até a diferenciação plena das células e tecidos, levando a formação de

uma nova planta (P). Nesse contexto, quanto maior a organização e diferenciação dos tecidos, menor foi a expressão do elemento retrotransposon TE010.

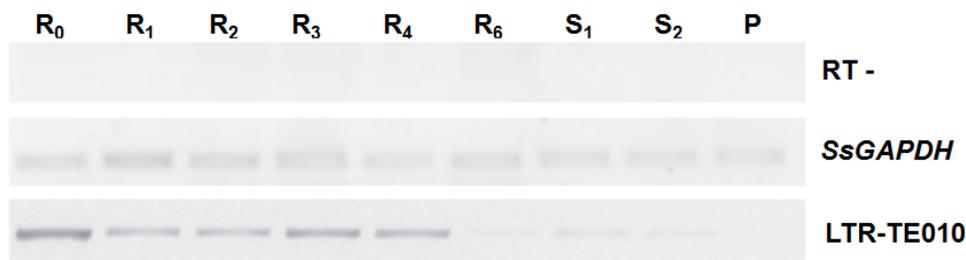


Figura 33 - Análise do LTR retrotransposon TE010 durante as fases de desenvolvimento *in vitro* de cana-de-açúcar. R₀: discos foliares antes de serem introduzidos no meio de cultura MS3c; R₁ a R₆: estágios de subcultivo referentes a calos com 1 a 6 meses de idade, respectivamente; S₁: calos na luz em início de regeneração; S₂: calos na luz com a formação das primeiras brotações; P: plantas regeneradas *in vitro*. O controle negativo (RT-) representa a reação de PCR sem ter ocorrido RT. A normalização do cDNA foi realizada com o gene controle *SsGAPDH*

Em virtude da repetição de alguns resultados decidiu-se reduzir, sem prejuízos, o número de amostras para R₀, R₂, R₄, R₆, S₁ e P. A única diferença foi que a amostra R₀ não sofreu o processo de assepsia. Sendo assim, realizaram-se os RT-PCRs para análise de expressão dos LTR retrotransposons TE028, TE070 e TE053. O procedimento foi o mesmo adotado para o retroelemento TE010, no entanto, aumentou-se o número de ciclos de 25 para 27. A Figura 34 representa os resultados das reações de amplificação para todos os elementos, em gel de agarose (1%), incluindo o TE010 para análise comparativa.

Adicionalmente, avaliou-se a expressão do gene *Knotted1* (*Kn1*) na tentativa de estabelecer um padrão molecular de desenvolvimento associado a caracterização morfológica do desenvolvimento *in vitro*. Em milho, o gene *knotted1* (*Kn1*) é expresso em meristemas, sendo ausente nas folhas, mesmo na região meristemática onde ocorre a formação do primórdio foliar (VOLLBRECHT et al., 2000). Dentro da região meristemática, o mRNA do gene *Kn1* desaparece nas células que formarão o próximo primórdio foliar (VOLLBRECHT et al., 2000).

A expressão do gene *SsKn1* (Figura 34) aumentou gradualmente de R₂ até R₆. Entretanto, houve uma diminuição da expressão no estágio S₁. Esse resultado confirma o que foi mostrado por Vollbrecht et al. (2000), isto é, ocorreu um aumento na expressão do gene *Kn1* durante a formação dos embriões somáticos e atingiu um nível

mais elevado de expressão onde os embriões estavam mais desenvolvidos (calos embriogênicos - estágio R₆), já que possuem uma estrutura de meristema apical mais organizada do que calos nos estágios R₂ e R₄. No entanto, quando iniciou a regeneração e formação dos primórdios foliares (estágio S₁), a expressão do gene *Kn1* foi reduzida.



Figura 34 - Análise do LTR retrotransposon TE010, TE070, TE028 e TE053 durante as fases de desenvolvimento *in vitro* de cana-de-açúcar. R₀: discos foliares antes de serem introduzidos no meio de cultura MS3c; R₂, R₄ e R₆: estágios de subcultivo referentes a calos com 2, 4 e 6 meses de idade, respectivamente; S₁: calos na luz em início de regeneração; P: plantas regeneradas *in vitro*. O controle negativo está representado pela linha RT-. A normalização dos cDNA está indicada pela linha *SsGAPDH*. O padrão molecular para a formação de embriões somáticos foi analisada pelo gene *SsKn1*

Notou-se que a expressão dos LTR retrotransposons TE070, TE028 e TE053 seguem entre eles um padrão similar de expressão ao longo do desenvolvimento *in vitro*, assemelhando-se ao apresentado para o retroelemento TE010. Além disso, observou-se que a maior atividade dos retrotransposon *in vitro* é na fase de calos, apesar da diferença entre os níveis de expressão entre R₂, R₄ e R₆. Esse resultado reafirmou o que foi constatado por Hirochika et al. (1996), Rossi et al. (2001), De Araújo et al. (2005). Semelhantemente ao observado para a análise de expressão do

retrotransposon TE010 (Figura 34), depois do maior nível de expressão atingido pelo TE010 em R₄, ocorre uma diminuição na expressão a partir de R₆. Esse decréscimo continua no estágio de formação dos primórdios foliares (S₁), chegando a praticamente não ser mais detectado quando é analisada a expressão desses retrotransposons no estágio de plantas (P).

É importante destacar que as atividades transcricionais apresentadas não necessariamente representam atividades de transposição. No entanto, a transcrição é a primeira etapa para que a transposição ocorra, conforme mencionado por de Araújo et al. (2005). No entanto, a relação direta entre transcrição (expressão) e transposição pode ser apenas detectada em condições específicas, como é o caso da cultura de tecidos (OKAMOTO; HIROCHIKA, 2001; CASACUBERTA; SANTIAGO, 2003;).

Calos, principalmente no estágio R₄, foram os tecidos que apresentaram maior atividade dos LTR retrotransposons, para ambos os quatro elementos analisados (TE010, TE070, TE028 e TE053), e embora nenhuma correlação tenha sido aferida, o envolvimento dos elementos de transposição em relação a variação somaclonal não podem ser excluídos, principalmente, orientado pelos trabalhos de Hirochika et al. (1996, 2000) e Zucchi et al. (2002).

Os dados gerados para os quatro LTR retrotransposons indicam que as atividades desses elementos podem estar sob estrito controle genético e/ou epigenético, principalmente durante as fases de maior diferenciação no desenvolvimento *in vitro*.

Embora a maioria dos ETs esteja transcricionalmente silenciada, eles estão frequentemente não regulados em mutantes com diminuição da metilação do DNA (LIPPMAN et al., 2003). Essa regulação pode ocorrer basicamente de duas maneiras: ao nível transcricional e ao nível pós-transcricional. Uma importante via de regulação ao nível transcricional está orientada pelo gene *Ddm1* (TSUKAHARA et al., 2009), enquanto que ao nível pós-transcricional é pelo orientado pela degradação dos mRNA-alvos mediada pelo siRNAs, cuja produção está fortemente relacionada a expressão da RNA polimerase 2 dependente de RNA (*RDR2*) (JIA et al., 2009). Em milho, os homólogos do gene *RDR2* de *Arabidopsis* foram caracterizados como *Mop1* (ALLEMAN et al., 2006).

A perda da metilação do DNA nos mutantes *ddm1* está associada com a desregulação transcricional dos ETs. Assim, a proteína DDM1 parece ter função chave no controle de retrotransposição, pois mutantes *ddm1* foram essenciais para ativação e mobilização de retrotransposons silenciados (HIROCHIKA et al., 2000; MIURA et al., 2001, SINGER et al., 2001; TSUKAHARA et al., 2009).

Já em milho, a perda da função em mutante *mop1* resultou na reativação dos ETs transcricionalmente silenciados e uma substancial redução no acúmulo dos pequenos RNAs de interferência (siRNAs) de 24nt, que recrutam componentes do mecanismo de silenciamento por RNA (JIA et al., 2009).

Nesse contexto, buscou-se avaliar a expressão dos genes endógenos *Ddm1* e *Mop1* durante o desenvolvimento *in vitro* de cana-de-açúcar, no intuito de analisar a relação desses genes no controle de expressão dos quatro LTR retrotransposons em estudo.

4.5.1.3 Análise de expressão dos genes *SsDdm1*, *SsMop1*

Hirochika et al. (2000) mostraram que em plantas de *Arabidopsis* mutantes para o gene *ddm1*, os LTR retrotransposons *Tto1* e *Tar17* estavam transcricionalmente e transposicionalmente ativos. Entretanto, quando a função do gene *Ddm1* foi reestabelecida pelo cruzamento com uma planta não mutante, os retrotransposons *Tto1* e *Tar17* foram silenciados, indicando que a função do gene *Ddm1* foi necessária para supressão dos retrotransposons.

De acordo com a análise de expressão do gene *SsDdm1* (Figura 35), observou-se diferente acúmulo dos transcritos deste ao longo das fases de desenvolvimento *in vitro* de cana-de-açúcar. Os maiores níveis de expressão de *SsDdm1* foram notados em calos nos estágios R₂ e R₆. Em calos no estágio R₄ e no início da formação dos primórdios foliares (S₁) acúmulo de transcritos deste gene foi menor. Por sua vez, nos estágios R₀ e P o acúmulo de transcritos do gene *SsDdm1* não foi detectado nas condições avaliadas.



Figura 35 - Análise de expressão dos genes *SsDdm1* e *SsMop1* durante as fases de desenvolvimento *in vitro* de cana-de-açúcar. R₀: discos foliares antes de serem introduzidos no meio de cultura MS3c; R₂, R₄ e R₆: estágios de subcultivo referentes a calos com 2, 4 e 6 meses de idade, respectivamente; S₁: calos na luz em início de regeneração; P: plantas regeneradas *in vitro*. O controle negativo (RT-) representa a reação de PCR sem ter ocorrido RT. A normalização dos cDNA foi realizada com o gene *SsGAPDH*

Analisando-se a relação entre os níveis de expressão dos LTR retrotransposons (item 4.5.1.2) e do gene *SsDdm1*, observou-se que nas fases de desenvolvimento *in vitro* que apresentaram maior acúmulo do gene endógeno *Ddm1* (R₂ e R₆) notou-se menor acúmulo de transcritos dos quatro retroelementos avaliados. Já na fase de R₄, onde o nível de expressão de *SsDdm1* foi menor, o acúmulo de transcritos dos ETs atingiu o maior nível detectado.

Diante disso, sugere-se uma correlação negativa entre a expressão do gene *SsDdm1* e o acúmulo de transcritos dos LTR retrotransposons. Em outras palavras, onde há maior expressão do gene *SsDdm1* observa-se menor expressão dos retroelementos, enquanto em baixa expressão de *SsDdm1* ocorre maior acúmulo desses elementos, sugerindo efeito do gene *SsDdm1* no controle de expressão dos quatro LTR retrotransposons avaliados. Esse resultado confirma o que foi relatado por Hirochika et al. (2000), no qual mutantes *ddm1* apresentaram reativação e transposição de dois retrotransposons (Tos10 e Tos17), que estavam anteriormente silenciados em plantas selvagens para o gene *Ddm1*. Gendrel et al. (2002) observou que em mutantes *ddm1*, a perda da metilação do DNA, acompanhada pela alteração no padrão de metilação das histonas H3K9 e H3K4 estava correlacionada com a reativação transcricional dos ETs. Mutantes *ddm1* promoveram o acúmulo de transcritos de seis transposons (LIPPMAN et al., 2003). Slotkin et al. (2009) relataram que expressão dos TEs coincide com a baixa expressão do gene *Ddm1*.

Entretanto, no estágio onde se iniciou a formação dos primórdios foliares (S_1), tanto os níveis de expressão do gene *SsDdm1* como dos retrotransposons foram baixos. Hirochika et al. (2000), com base em seus resultados, sugeriram que o aumento no acúmulo de transcritos do retrotransposon *Tto1* provocou aumento da metilação e o silenciamento desse retroelemento. Diante disso, suspeita-se que o acúmulo de transcritos dos TEs na fase R_4 deva ter “disparado” a regulação desses elementos, a qual foi constatada a partir do estágio em R_6 pela redução dos transcritos dos quatro retrotransposons. A regulação permaneceu durante os estágios de desenvolvimento S_1 e P, sendo este último, a fase em que o acúmulo de transcrito para os ETs não foi detectado.

Em relação a análise de expressão do gene *SsMop1* (Figura 35) foi observado que nas condições avaliadas não ocorreu o acúmulo de transcritos desse gene em nenhum dos seis estágios do desenvolvimento *in vitro* de cana. No entanto, esse resultado pode não representar o ocorrido, uma vez que a sequência do gene *Mop1* anotada no banco de dados de cana-de-açúcar não estava completa, o que necessita novas análises para uma aferição mais precisa.

Além disso, análises do padrão de metilação na região reguladora dos ETs através do sequenciamento por bissulfito (descrito recentemente por DENG et al. (2009) para verificação da atividade do gene endógeno *Ddm1* em cana-de-açúcar na regulação transcricional, assim análises do acúmulo dos siRNAs (por Northern blot), envolvidos na regulação pós-transcricional, continuarão a ser investigadas no intuito compreender melhor a regulação epigenética dos ETs durante o desenvolvimento *in vitro* de cana-de-açúcar.

3.5.1.4 Análise de expressão do TE010 em diferentes tecidos

As variedades de cana-de-açúcar comerciais são na maioria das vezes alopoliploides derivados da hibridização interespecífica entre as espécies *S. officinarum* ($2n = 70-140$) e *S. spontaneum* ($2n = 36-128$). Recentemente, foi demonstrado que retrotransposons são também ativados pela hibridização interespecífica (KASHKUSH et al., 2002) e, conseqüentemente, contribuem para os rearranjos cromossômicos e a modificação da expressão de genes adjacentes (KASHKUSH et al., 2003).

Diante disso, decidiu-se analisar a expressão do TE010 nas duas principais espécies que compõem o genoma dos híbridos interespecíficos atuais, *S. officinarum* e *S. spontaneum*. Avaliou-se para cada espécie a expressão na lâmina foliar e no ápice caulinar, compreendido pelo “leaf roll” (“palmito”) e o meristema apical (Figura 36). Analisou-se para o híbrido comercial RB835486 o nível de expressão do TE010 em quatro diferentes tecidos de cana-de-açúcar, os quais são representados por lâmina foliar, bainha foliar, “leaf roll” ou “palmito” e gema axilar (Figura 37). A normalização das amostras foi realizada com o gene controle *SsGAPDH*.

Conforme mostrado na Figura 36, foi observado que não houve diferença entre os níveis de expressão do retrotransposon TE010 nos tecidos ápice caulinar e laminar foliar para ambas as espécies do gênero *Saccharum*. Isso possibilita inferir que o mecanismo envolvido na regulação do TE010 parece ser bastante conservado entre as duas principais espécies que compõem o genoma dos híbridos interespecíficos atuais. Além disso, a atividade do retroelemento TE010 está nas espécies ancestrais, mesmo anteriormente ao cruzamento.

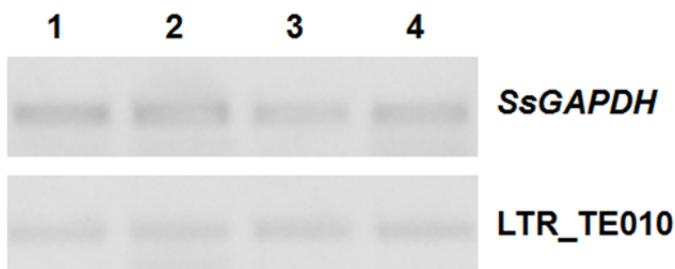


Figura 36 - Análise do LTR retrotransposon TE010 nas espécies *S. officinarum* e *S. spontaneum* que compõem os híbridos interespecíficos atuais. 1 e 2: Respectivamente, ápice caulinar e lâmina foliar da espécie *S. officinarum*. 3 e 4: Respectivamente, ápice caulinar e lâmina foliar da espécie *S. spontaneum*. A normalização foi realizada com o gene controle *SsGAPDH*

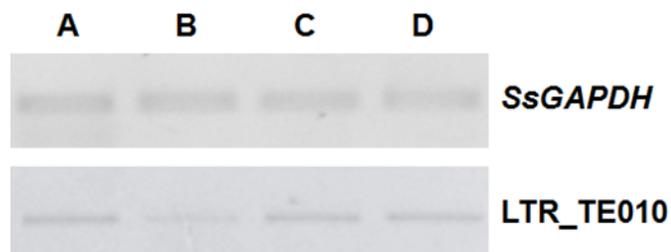


Figura 37 - Análise do LTR retrotransposon TE010 em 4 diferentes tecidos do híbrido interespecífico RB835486: lâmina foliar (A), bainha foliar (B), “leaf roll” (C) e gema axilar (D). A normalização foi realizada com o gene controle *SsGAPDH*

Nos tecidos do híbrido interespecífico RB835486, observou-se que o nível de expressão do TE010 foi similar entre os tecidos lâmina foliar, “leaf roll” e gema axilar (Figura 37). Já o acúmulo de transcritos para esse elemento nas células da bainha foliar foi menor. De Araújo et al. (2005) observaram também a expressão do TE010 em “leaf roll”. Esses autores detectaram a expressão desse elemento em flores e calos, a qual não foi detectada no meristema apical. A atividade do retrotransposon parece estar mais relacionada a condição em que o tecido está submetido, do que em relação a localização num determinado tecido.

5 CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados apresentados, conclui-se que:

1- O período transcorrido, desde a introdução do explante *in vitro*, para obtenção de plantas regeneradas a partir de discos foliares foi de cerca de 6 a 8 semanas, enquanto que a partir de calos foi de 10 a 12 semanas.

2- A partir de calos embriogênicos, a aplicação exógena do peptídeo hormonal CLV3, na maior concentração testada (25 μ M), promoveu efeito na diferenciação celular, representada pelo aumento no número de brotações. Já o peptídeo PSK- α possibilitou um aumento destacado da proliferação celular e da regeneração de plantas.

3- Embora a proteína *Ddm1* de *A. thaliana* (*AtDdm1*) esteja num clado mais distante que as da família Poaceae, os aminoácidos dos domínios conservados da proteína *SsDdm1* possuem 63,7% de identidade com os da proteína *AtDdm1*, indicando alta conservação entre elas.

4- A transformação genética de cana-de-açúcar pelo método da biolística, através da co-transformação com os genes *neo* e *AtDdm1*, é possível para as variedades RB835089 e RB835485 utilizando calos embriogênicos e discos foliares como explantes alvo;

5- Análises de expressão durante o desenvolvimento *in vitro* de cana-de-açúcar mostraram maior expressão dos LTR retrotransposons TE010, TE070, TE028 e TE053 durante o estágio de calos, enquanto que a partir do início da regeneração os níveis de expressão foram reduzidos.

6- Análise de expressão do gene *SsDdm1* indicou possível correlação desse gene no controle dos LTR retrotransposons durante o desenvolvimento *in vitro* de cana-de-açúcar.

7- O gene *AtDdm1* demonstra ser importante no silenciamento do LTR retrotransposon TE010, uma vez que a expressão heteróloga do transgene *AtDdm1* em cana-de-açúcar apontou menor expressão do LTR retrotransposon TE010, indicando possível controle da atividade do retroelemento.

REFERÊNCIAS

- AHMADABADI, M.; RUF, S.; BOCK, R. A leaf-based regeneration and transformation system for maize (*Zea mays* L.). **Transgenic Research**, London, v. 16, p. 437-448, 2007.
- ALLEMAN, M.; SIDORENKO, L.; MCGINNIS, K.; SESHADRI, V.; DORWEILER, J.E.; WHITE, J.; SIKKINK, K.; CHANDLER, V.L. An RNA-dependent RNA polymerase is required for paramutation in maize. **Nature**, v. 442, p. 295-8, 2006.
- ARENCIBIA, A.; CARMONA, E.; CORNIDE, M. T.; CASTIGLIONE, S.; O'RELLY, J.; CINEA, A.; ORAMAS, P.; SALA, F. Somaclonal variation in insectresistant transgenic sugarcane (*Saccharum* hybrid) plants produced by cell electroporation. **Transgenic Res.** 8:349–360; 1999.
- ARENCIBIA, A.D.; CARMONA, E.R.; TÉLLEZ, P.; CHAN, M-T.; YU, S-M.; TRUJILLO, L.E.; ORAMAS, P. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum spp.* L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Transgenic Research**, London, v. 7, p. 213–222, 1998.
- ARVINTH, S.; ARUN, S.; SELVAKESAVAN, R. K; SRIKANTH, J.; MUKUNTHAN, N.; KUMAR, A.P.; PREMACHANDRAN, M. N.; SUBRAMONIAN, N. Genetic transformation and pyramiding of aprotinin-expressing sugarcane with cry1Ab for shoot borer (*Chilo infuscatellus*) resistance. **Plant Cell Rep**, v. 29, p. 383-395, 2010.
- BARBOSA, A.L. **Regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos e discos foliares visando transformação genética de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. 2010. 64 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.
- BENNETZEN, J.L. Transposable element contributions to plant genome evolution. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 42, p. 251–269, 2000.
- BIRCH, R.G. New gene technologies and their potential value for sugarcane. **Outlook on Agriculture**, Bracknell, v. 25, p. 219–226, 1996.
- _____. Plant transformation: problems and strategies for practical application. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 297-326, 1997.
- BIRCH, R.G.; MARETZKI, A. Transformation of sugarcane. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Plant protoplasts and genetic engineering IV**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1993. p. 348–360. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 23).
- BOLLER, T. Peptide signalling in plant development and self/non-self perception. **Current Opinion in Cell Biology**, London, v. 17, p. 116-122, 2005.

- BOTHA, F. C.; VORSTER, D. J. Analysis of carbon partitioning to identify metabolic steps limiting sucrose accumulation. In: Singh, V.; Kumar, V., eds. **Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.**, New Delhi, v. 23, p. 259–272; 1999.
- BOWER, R.; BIRCH, R.G. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. **Plant Journal**, Oxford, v. 2, p. 409–416, 1992.
- BOWER, R.; ELLIOTT, A.R.; POTIER, B.A.M.; BIRCH, R.G. High-efficiency, microprojectile-mediated cotransformation of sugarcane, using visible or selectable markers. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 2, p. 239–249, 1996.
- BRAGA, D.P.V.; ARRIGONI, E.D.B.; SILVA-FILHO, M.C.; ULIAN, E.C. Expression of Cry1Ab protein in genetically modified sugarcane for the control of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of New Seeds**, West Hazleton, v. 5, p. 209–222, 2003.
- BRAND, U.; FLETCHER, J.C.; HOBO, M.; MEYEROWITZ, E.M.; SIMON, R. Dependence of stem cell fate in Arabidopsis on a feedback loop regulated by *CLV3* activity. **Science**, Washington, v. 289, p. 617–619, 2000.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 01 jul. 2009.
- BRZESKI, J.; JERZMANOWSKI, A. Deficient in DNA methylation 1 (DDM1) defines a novel family of chromatin-remodeling factors. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, p. 823–828, 2003.
- BURNER, D.M.; GRISHAM, M.P. Induction and stability of phenotypic variation in sugarcane as affected by propagation procedure. **Crop Science**, Madison, v. 35, p. 875–880, 1995.
- BUTTERFIELD, M.K.; IRVINE, J.E.; GARZA, M.V.; MIRKOV, T.E. Inheritance and segregation of virus and herbicide resistance transgenes in sugarcane. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 104, p. 797–803, 2002.
- CALDAS, L.S.; TORRES, A.C.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, Produção de Informação, 1998. v. 1, 509 p.
- CALSA JR, T.; FIGUEIRA, A. Serial analysis of gene expression in sugarcane (*Saccharum* spp.) leaves revealed alternative C4 metabolism and putative antisense transcripts. **Plant Molecular Biology**, v. 63, p. 745–762, 2007.
- CARLES, C.C.; FLETCHER, J.C. Shoot apical meristem maintenance: the art of a dynamic balance. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 8, p. 394–401, 2003.

CASACUBERTA, J.M.; SANTIAGO, N. Plant LTR-retrotransposons and MITEs: control of transposition and impact on the evolution of plant genes and genomes. **Gene**, Spain, v. 311, p. 1-11, 2003.

CHEN, W.H.; DAVEY, M.R.; POWER, J.B.; COCKING, E.C. Control and maintenance of plant regeneration in sugarcane callus cultures. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 39, n. 199, p. 251-261, 1988.

CHEN, W.H.; GARTLAND, K.M.A.; DAVEY, M.R.; SOTAK, R.; GARTLAND, J.S.; MULLIGAN, B.J.; POWER, J.B.; COCKING, E.C. Transformation of sugarcane protoplasts by direct uptake of a selectable chimeric gene. **The Plant Cell Reports**, New York, v. 6, p. 297-301, 1987.

CHENGALRAYAN, K.; GALLO-MEAGHER, M. Effect of various growth regulators on shoot regeneration of sugarcane. **In vitro Cellular and Developmental Biology. Plant**, Oxon, v. 37, p. 434-439, 2001.

CHRISTENSEN, A.H.; QUAIL, P.H. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. **Transgenic Research**, London, v. 5, p. 213–218, 1996.

CHRISTENSEN, A.H.; SHARROCK, R.A.; QUAIL, P.H. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 18, p. 675–689, 1992.

CHU, C-C.; WANG, C-C.; SUN, C-S.; HSU, C.; YIN, K-C.; CHU, C-Y.; BI, F.Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. **Scientia Sinica**, Beijing, v. 18, p. 659–668, 1975.

CIDADE, D.A.P.; GARCIA, R.O.; DUARTE, A.C.; SACHETTO-MARTINS, G.; MANSUR, E. Morfogênese in vitro de variedades brasileiras de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 3, p. 385-391, 2006.

CLARK, S.E. Cell signaling at the shoot meristem. **Nature Reviews, Molecular Cell Biology**, London, v. 2, p. 276–284, 2001.

COCK, J.M.; McCORMICK, S. A large family of genes that share homology with CLAVATA3. **Plant Physiology**, Rockville, v. 126, p. 939–942, 2001.

CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA. **Guia da cana-de-açúcar: avanço científico beneficia o país**. São Paulo, 2009. 20 p.

CORNEJO, M.J.; LUTH, D.; BLANKENSHIP, K.M.; ANDERSON, O.D.; BLECHL, A.E. Activity of a maize ubiquitin promoter in transgenic rice. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 23, p. 567–581, 1993.

DANIELS, J.; ROACH, B.T. Taxonomy and evolution. In: HEINZ, D.J. (Ed.). **Sugarcane**

improvement through breeding. Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 7-84.

DE BLOCK, M. The cell biology of plant transformation: Current status, problems, prospects and the implications for the plant breeding. *Euphytica*, v. 71, p. 1-14, 1993.

DE ARAUJO, P.G.; ROSSI, M.; DE JESUS, E.M.; SACCARO JR., N.L.; KAJIHARA, D.; MASSA, R.; MARIA DE FELIX, J.; DRUMMOND, R.D.; FALCO, M.C.; CHABREGAS, S.M.; ULIAN, E.C.; MENOSSI, M.; VAN SLUYS, M-A. Transcriptionally active transposable elements in recent hybrid sugarcane. **The Plant Journal**, Oxford, v. 44, p. 707-717, 2005.

DENG, J.; SHOEMAKER, R.; XIE, B.; GORE, A.; LEPROUST, E.M.; ANTOSIEWICZ-BOURGET, J.; EGLI, D.; MAHERALI, N.; PARK, I.H.; YU, J.; DALEY, G.Q.; EGGAN, K.; HOCHEDLINGER, K.; THOMSON, J.; WANG, W.; GAO, Y.; ZHANG, K. Targeted bisulfite sequencing reveals changes in DNA methylation associated with nuclear reprogramming. **Nature Biotechnology**, New York, v. 27, n. 4, p. 353-360, 2009.

DESAI, N.S.; SUPRASANNA, P.; BAPAT, V.A. Simple and reproducible protocol for direct somatic embryogenesis from cultured immature inflorescence segments of sugarcane (*Saccharum* spp.). **Current Science**, Bangalore, v. 87, p. 764–768, 2004.

DESAI, N.S.; JOSEPH, D.; SUPRASANNA, P.; BAPAT, V.A. Study of elemental variations during somatic embryogenesis in sugarcane using photon induced X-ray probe. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research. B**, Amsterdam, v. 252, p. 299–302, 2006.

D'HONT, A. Unraveling the genome structure of polyploids using FISH and GISH; examples of sugarcane and banana. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 109, p. 27-33, 2005.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemistry Bullentin**, London, n.19, p. 11-15, 1987.

ELLIOTT, A.R.; GEIJSKES, R.J.; LAKSHMANAN, P.; McKEON, M.G.; WANG, L.F.; BERDING, N.; GROF, C.P.L.; SMITH, G.R. Direct regeneration of transgenic sugarcane following microprojectile transformation of regenerable cells in thin transverse section explants. In: INTERNATIONAL ASSOCIATION PLANT CULTURE BIOTECHNOLOGY, **Proceedings...**, Orlando, p. 1376, 2002.

ENRIQUEZ-OBREGON, G.A.; VÁZQUEZ-PADRÓN, R.; PRIETO-SAMSONOV, D.L.; DE LA RIVA, G.A.; SELMAN-HOUSEIN, G. Herbicide resistant sugarcane plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. **Planta**, Berlin, v. 206, p. 20–27, 1998.

FAO. Disponível em: <<http://apps.fao.org>>. Acesso em: 06 jun. 2010.

FALCO, M.C. **Transformação de cana-de-açúcar para resistência do herbicida glufosinato de amônio via biolística.** 1998. 129 p. Tese (Doutorado em Genética e

Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

FALCO, M.C.; SILVA-FILHO, M.C. Expression of soybean proteinase inhibitors in transgenic sugarcane plants: effects on natural defense against *Diatraea saccharalis*. **Plant physiology and Biochemistry**, Paris, v.41, p. 761-766, 2003.

FALCO, M.C., TULMANN NETO, A.T.; ULIAN, E.C. Transformation and expression of a gene for herbicide resistance in a Brazilian to sugarcane. **Plant Cell Reports**, New York, v. 19, p. 1188–1194, 2000.

FALCO, M.C.; MENDES, B.M.J.; TULMANN NETO, A.; GLORIA, B.A. da. Histological characterization of *in vitro* regeneration of *Saccharum* sp. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 9, p. 93-97, 1996.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: Na approach using the bootstrap. **Evolution**, Lancaster, v. 39, p. 783-791, 1985.

FERREIRA, M.G.R; CARVALHO, C.S.H.; CARNEIRO, A.A.; CÁRDENAS, F.E.N. Introdução de genes em segmentos foliares de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* schumm.) usando biobalística. **Ciência rural**, Santa Maria, v.34, n.1, p. 279-280, 2004.

FESCHOTTE, C.; ZHANG, X.; WESSLER, S. Miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) and their relationship with established DNA transposons. **Nature Review of Genetics**, v. 3, p. 1147–58, 2002.

FIERS, M.; GOLEMIEC, E.; XU, J.; VAN DER GEEST, L.; HEIDSTRA, W.S.R. The 14-amino acid CLV3, CLE19, and CLE40 peptides trigger consumption of the root meristem in *Arabidopsis* through a CLAVATA2-dependent pathway. **Plant Cell**, Baltimore, v. 17, p. 2542-2553, 2005.

FIERS, M.; KU, K. L.; LIU, C-M. CLE peptide ligands and their roles in establishing meristems. **Current Opinion in Plant Biology**, v.10, p. 39-43, 2007.

FITCH, M.; DE LA CRUZ, A.; MOORE, P. Effectiveness of different selection markers for sugarcane transformation. In: INTERNATIONAL PLANT GENOME CONFERENCE, 1995, **Plant genome II: proceedings...** p. 57.

FITCH, M.M.M.; MOORE, P.H. Comparison of 2,4-D and picloram for selection of long-term totipotent green callus cultures of sugarcane. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.20, p.157-163, 1990.

FLETCHER, J.C.; BRAND, U.; RUNNING, M.P.; SIMON, R.; MEYEROWITZ, E.M. Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in *Arabidopsis* shoot meristems. **Science**, Washington, v. 283, p. 1911–1914, 1999.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agrianual 2010**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2010.

FRANKLIN, G.; ARVINTH, E.S.; SHEEBA, C.J.; KANCHANA, M.; SUBRAMONIAN, N. Auxin pretreatment promotes regeneration of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) midrib segment explants. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 50, p. 111–119, 2006.

FUKUDA, H.; HIRAKAWA, Y.; SAWA, S. Peptide signaling in vascular development. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2007

GALLO-MEAGHER, M.; IRVINE, J.E. Effects of tissue type and promoter strength on transient GUS expression in sugarcane following particle bombardment. **Plant Cell Reports**, New York, v. 12, p. 666–670, 1993.

GALLO-MEAGHER, M.; IRVINE, J.E. Herbicide resistant sugarcane containing the *bar* gene. **Crop Science**, Madison, v. 36, p. 1367–1374, 1996.

GALLO-MEAGHER, M.; ENGLISH, R.G.; ABOUZID, A. Thidiazuron stimulates shoot regeneration of sugarcane embryogenic callus. **In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant**, Oxon, v. 36, p. 37–40; 2000.

GAMBLEY, R.L.; FORD, R. SMITH, G.R. Microprojectile transformation of sugarcane meristems and regeneration of shoots expressing β -glucuronidase. **Plant Cell Reports**, New York, v. 12, p. 343–346, 1993.

GAMBLEY, R.L.; BRYANT, J.D.; MASEL, N.P.; SMITH, G.R. Cytokinin enhanced regeneration of plants from microprojectile bombarded sugarcane meristematic tissue. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 21, p. 603–612, 1994.

GEIJSKES, R.J.; WAN, L.F.; LAKSHMANAN, P.; MCKEON, M.G.; BERDING, N.; SWAIN, R.S.; ELLIOTT, A.R.; GROF, C.P.L.; JACKSON, J.; SMITH, G.R. Smartsette seedlings: tissue culture seed plants for Australian sugar industry. **Sugar Cane International**, Port Talbot, p. 13–17, May/June 2003.

GILBERT, R.A.; GALLO-MEAGHER, M.; COMSTOCK, J.C.; MILLER, J.D.; JAIN, M.; ABOUZID, A. Agronomic evaluation of sugarcane lines transformed for resistance to sugarcane mosaic virus strain E. **Crop Science**, Madison, v. 45, p. 2060–2067, 2005.

GILL, R.; MALHOTRA, P.K.; GOSAL, S.S. Direct plant regeneration from cultured young leaf segments of sugarcane. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 84, p. 227–231, 2006.

GRANDBASTEIN, M.-A. Activation of plant retrotransposons under stress conditions. **Trends Plant Science**, Kidlington, v. 3, p. 181–187, 1998.

GROF, C.P.L.; CAMPBELL, J.A. Sugarcane sucrose metabolism: scope for molecular manipulation. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 28, p. 1–12, 2001.

GUIDERDONI, E.; DEMARLY, Y. Histology of somatic embryogenesis in cultured leaf segments of sugarcane plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 14, p. 71-88, 1988.

GUIDERDONI, E.; MEROT, B.; EKSOMTRAMAGE, T.; PAULET, F.; FELDMANN, P.; GLASZMANN, J.-C. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* species). In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Somatic embryogenesis and synthetic seed**. Berlin: Springer Verlag, 1995. p. 92-113. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 31).

HALL, T.A. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows. **Nucleic Acids Symposium Series**, New York, v.13, p. 1899-1911, 1999.

HANAI, H.; NAKAYAMA, D.; YANG, H.; MATSUBAYASHI, Y.; HIROTA, Y.; SAKAGAMI Y. Existence of a plant tyrosylprotein sulfotransferase: novel plant enzyme catalyzing tyrosine Osulfation of preprophytosulfokine variants in vitro. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 470, p. 97–101, 2000.

HEINZ, D.J.; MEE, G.W.P. Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. **Crop Science**. Madison, v. 9, p. 346–348, 1969.

HEERDT, E. **Indução da embriogênese somática em cana-de-açúcar**. 2008. 40p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

HIROCHIKA, H. Activation of tobacco retrotransposons during tissue culture. **EMBO Journal**, Oxford, v. 12, p. 2521–2528, 1993.

HIROCHIKA, H.; OKAMOTO, H.; KAKUTANI, T. Silencing of retrotransposons in *Arabidopsis* and reactivation by the *ddm1* mutation. **Plant Cell**, Baltimore, v. 12, p. 357-368, 2000.

HIROCHIKA, H.; SUGIMOTO, K.; OTSUKI, Y.; TSUGAWA, H.; KANDA, M. Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 93, p. 7783-7788, 1996.

HO, W.; VASIL, I.K. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) I. The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. **Protoplasma**, Leipzig, v. 118, p. 169-180, 1983.

HORN, M.E.; SHERRAD, J.H.; WIDHOLM, J.M. Photoautotrophic growth of soybean cells in suspension culture. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 72, p.426–429, 1983.

HOY, J.W.; BISCHOFF, K.P.; MILLIGAN, S.B.; GRAVOIS, K.A. Effect of tissue culture explant source on sugarcane yield components. **Euphytica**, Wageningen, v.129, p. 237–240, 2003.

IGASAKI, T.; AKASHI, N.; UJINO-IHARA, T.; MATSUBAYASHI, Y.; SAKAGAMI, Y.; SHINOHARA, K. Phytosulfokine stimulates somatic embryogenesis in *Cryptomeria japonica*. **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v. 44, p. 1412–1416, 2003.

INGELBRECHT, I.L.; IRVINE, J.E.; MIRKOV, T.E. Posttranscriptional gene silencing in transgenic sugarcane. Dissection of homology-dependent virus resistance in a monocot that has a complex polyploid genome. **Plant Physiology**, Rockville, v. 119, p. 1187–1197; 1999.

ITO, Y.; NAKANOMYO, I.; MOTOSE, H.; IWAMOTO, K.; SAWA, S.; DOHMAE, N. FUKUDA, H. Dodeca-CLE peptides as suppressors of plant stem cell differentiation. **Science**, Washington, v. 313, p. 842-845, 2006.

JEDDELOH, J.A.; BENDER, J.; RICHARDS, E.J. The DNA methylation locus *DDM1* is required for maintenance of gene silencing in *Arabidopsis*. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v.12, p. 1714–1725, 1998.

JEDDELOH, J.A.; STOKES, T.L.; RICHARDS, E.J. Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. **Nature Genetics**, New York, v. 22, p. 94–97, 1999.

JEFFERSON, R.A.; KAVANAGH, T.A.; BEVAN, M.W. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO Journal**, v. 6, p. 3901-3907, 1987.

JESUS, F.A. de. **Transformação genética de cana-de-açúcar com os genes da aquaporina SSpTIP1;1 e SspPIP1;4**. 2010. 55 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

KALUNKE, R.M.; KOLGE, A.M.; BABU, K.H.; PRASAD, D.T. *Agrobacterium* mediated transformation of sugarcane for borer resistance using *Cry 1Aa3* gene and one-step regeneration of transgenic plants. **Sugar Tech**, v. 11, p. 355-359, 2009.

KASHKUSH, K.; FELDMAN, M.; LEVY, A.A. Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat. **Nature Genetics**, v. 33, p. 102-106, 2003.

KASHKUSH, K.; FELDMAN, M.; LEVY, A.A. Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid. **Genetics**, v. 160, p. 1651-1659, 2002.

KATO, M.; TAKASHIMA, K.; KAKUTANI, T. Epigenetic control of CACTA transposon mobility in *Arabidopsis thaliana*. **Genetics**, Bethesda, v. 168, p. 961–969, 2000.

- KINOSHITA, A.; NAKAMURA, Y.; SASAKI, E.; KYOZUKA, J.; FUKUDA, H.; SAWA, S. Gain-of-Function Phenotypes of Chemically Synthetic CLAVATA3/ ESR-Related (CLE) Peptides in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. *Plant Cell Physiology*, Oxford, v. 48(12), p. 1821–1825, 2007.
- KLEIN, T.M.; GRADZILE, T.; FROMM, M.E.; SANFORD, J.C. Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high velocity of microprojectiles. **Nature biotechnology**, New York, v. 6, p. 559-563, 1987.
- KOBAYASHI, T.; EUN, C.; HANAI, H.; MATSUBAYASHI, Y.; SAKAGAMI, Y.; KAMADA H. Phytosulphokine-a, a peptidyl plant growth factor, stimulates somatic embryogenesis in carrot. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 50, p. 1123–1128, 1999.
- KONDO, T.; SAWA, S.; KINOSHITA, A.; MIZUNO, S.; KAKIMOTO, T.; FUKUDA, H.; SAKAGAMI, Y. A plant peptide encoded by CLV3 identified by in situ MALDI-TOF MS analysis. **Science**, Washington, v. 313, p. 845–848, 2006.
- LAKSHMANAN, P. Somatic embryogenesis in sugarcane: an addendum to the invited review 'sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. **In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant**, Oxon, v. 41, n. 4, p. 345–363, 2006.
- LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R.J.; AITKEN, K.S.; GROF, C.P.L.; BONNETT, G.D.; SMITH, G.R. Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. **In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant**, Oxon, v. 41, p. 345–363, 2005.
- LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R.J.; WANG, L.; ELLIOTT, A.; GROF, C.P.L.; BERDING, N.; GRANT, R.; SMITH, G.R. Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids) leaf culture. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 25, p. 1007-1015, 2006.
- LARKIN, P.; SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 60, p. 197-214, 1981.
- LIPPMAN, Z.; MAY, B.; YORDAN, C.; SINGER, T.; MARTIENSSEN, R. Distinct mechanisms determine transposon inheritance and methylation via small interfering RNA and histone modification. **PLoS Biology**, San Francisco, v. 1, p. 420-428, 2003.
- LISCH, D. Epigenetic regulation of transposable elements in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 60, p. 43-66, 2009.
- LIU, M.C. Sugarcane. In: SHARP, W.R.; EVANS, D.A.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan, v. 2. p. 572-605, 1984.
- LIU, M.C. Factors affecting induction, somatic embryogenesis and plant regeneration of sugarcane. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 141, p. 714-720, 1993.

- LIU, M.C.; CHEN, W.H. Histological studies on the origin and process of plantlet differentiation in sugarcane callus. **Proceedings of International Society of Sugarcane Technologists**, New Orleans, v. 15, p. 118-128, 1974.
- LOURENS, A.G.; MARTIN, F.A. Evaluation of *in vitro* propagated sugarcane hybrids for somaclonal variation. **Crop Science**, Madison, v. 27, p. 793-796, 1987.
- MA, H.; ALBERT, H. H.; PAULL, R.; MOORE, P. H. Metabolic engineering of invertase activities in different subcellular compartments affects sucrose accumulation in sugarcane cells. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 27, p. 1021–1030, 2000.
- McCLINTOCK, B. The significances of responses of the genome to challenge. **Science**, v. 226, p. 792-801, 1984.
- MANICKAVASAGAM, M.; GANAPATHI, A. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of sugarcane. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 36, p. 832–835, 1998.
- MANICKAVASAGAM, M.; GANAPATHI, A.; ANBAZHAGAN, V.R.; SUDHAKAR, B.; SELVARAJ, N.; VASUDEVAN, A.; KASTHURIRENGAN, S. Agrobacterium-mediated genetic transformation and development of herbicide resistant sugarcane (*Saccharum* species hybrids) using axillary buds. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 23, p. 134–143, 2004.
- MATZKE, M. A.; KANNO, T.; HUETTEL, B.; DAXINGER, L.; MATZKE, A.J. Targets of RNA-directed DNA methylation. **Current Opinion Plant Biology**, v. 10, p. 512–519, 2007.
- MATSUBAYASHI, Y.; TAKAGI, L.; SAKAGAMI, Y.. Phytosulfokine-alpha, a sulfated pentapeptide, stimulates the proliferation of rice cells by means of specific high- and low-affinity binding sites. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.94, p.13357–62, 1997.
- MATSUBAYASHI, Y.; TAKAGI, L.; OMURA, N.; MORITA, A.; SAKAGAMI, Y. The endogenous sulfated pentapeptide phytosulfokine-alpha stimulates tracheary element differentiation of isolated mesophyll cells of *zinnia*. **Plant Physiology**, v.120, P.1043-48, 1999.
- MATSUBAYASHI, Y.; SAKAGAMI, Y. Phytosulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p.7623–27, 1996.
- MATSUBAYASHI, Y.; SAKAGAMI, Y. Peptide hormones in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 649-674, 2006.
- MATSUOKA, S.; GARCIA, A.A.F.; ARIZONO, H. Melhoramento da cana-de-acucar. In: BOREM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Editora UFV, 2005. p. 205-251.

MELOTTO-PASSARIN, D.M. **Transformação genética de cana-de-açúcar por biolística e *Agrobacterium tumefaciens* visando estudar o mecanismo de morte celular programada**. 2009. 147 p. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

MIURA, A.; YONEBAYASHI, S.; WATANABE, K.; TOYAMA, T.; SHIMADAK, H.; KAKUTANI, T. Mobilization of transposons by a mutation abolishing full DNA methylation in Arabidopsis. **Nature**, London, v. 411, n. 6834, p. 212–214, May, 2001.

MOHATKAR, F.; CHAUDHARI, A.N.; DEOKAR, A.B.; SHAH, B.S. Organogenesis in *Saccharum officinarum* L. variety Co 740. **Current Science**, Bangalore, v. 64, p. 604-605, 1993.

MOLINARI, H.B.C. **Expressão estresse-induzida do gene *p5cs* em plantas transgênicas de cana-de-açúcar submetidas ao déficit hídrico**. 2006. 124p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MUDGE, S.R.; OSABE, K.; CASU, R.E.; BONNETT, G.D.; MANNERS, J.M.; BIRCH, R.G. Efficient silencing of reporter transgenes coupled to known functional promoters in sugarcane, a highly polyploidy crop species. **Planta**, Berlin, v. 229, p. 549-558, 2009.

MÜLLER, R.; BORGHI, L.; KWIATKOWSKA, D.; LAUFS, P.; SIMON, R. Dynamic and Compensatory Responses of Arabidopsis Shoot and Floral Meristems to CLV3 Signaling. **The Plant Cell**, v. 18, p. 1188–1198, 2006.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NEUTEBOOM, L.W.; KUNIMITSU, W.Y.; WEBB, D.; CHRISTOPHER, D.A. Characterization and tissue-regulated expression of genes involved in pineapple (*Ananas comosus* L.) root development. **Plant Science**, Limerick, v. 163, p. 1021-1035, 2002.

OKAMOTO, H.; HIROCHIKA, H. Silencing of transposable elements in plants. **Trends in Plant Science**, v. 6, p. 527-534, 2001.

OLSEN, A.N.; MUNDY, J.; SKRIVER, K. Peptomics, identification of novel cationic Arabidopsis peptides with conserved sequence motifs. **In Silico Biology**. Tokyo, v. 2, p. 441-451, 2002.

PESCHKE, V.M.; PHILLIPS, R.L.; GENGENBACH, B.G. Discovery of transposable element activity among progeny of tissue culture-derived maize plants. **Science**, v. 238, p. 804-807, 1987.

RAJESWARI, S.; THIRUGNANAKUMAR, S.; ANANDAN, A.; KRISHNAMURTHI, M. Somaclonal variation in sugarcane through tissue culture and evaluation for quantitative and quality traits **Euphytica** v. 168, p. 71-80, 2009.

RANGWALA, S.H.; RICHARDS, E.J. Differential epigenetics regulation within an *Arabidopsis* retroposon family. **Genetics**, Bethesda, 2007. In press.

ROSSI, M., ARAUJO, P.G.; VAN SLUYS, M.A. Survey of transposable elements in sugarcane expressed sequence tags (ESTs). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 24, p. 147-154, 2001.

RATHUS, C.; BIRCH, R.G. Stable transformation of callus from electroporated sugarcane protoplasts. **Plant Science**, v. 82, p. 81–89, 1992.

RYAN, C.A.; PEARCE, G.; SCHEER, J.; MOURA, D. S. Polypeptides hormones. **The Plant Cell**, Rockville, suppl. p. 251-264, 2002.

SANMIGUEL, P.; BENNETZEN, J.L. Evidence that a recent increase in maize genome size was caused by the massive amplification of intergene retrotransposons. **Annals of Botany**, London, v. 81, p. 37-44, 1998.

SANMIGUEL, P.; TIKHONOV, A.; JIN, Y.K.; MELAKE-BERHAN, A.; SPRINGER, P.S.; EDWARDS, K.J.; AVRAMOVA, Z.; BENNETZEN, J.L. Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. **Science**, Washington, v. 274, p. 765-768, 1996.

SAWA, S.; KINOSHITA, A.; NAKANOMYO, I.; FUKUDA, H. CLV3/ESR-Related (CLE) peptides as intercellular signaling molecules in plants. **The Chemical Record**, New York, v. 6, p. 303-310, 2006.

SAZE, H.; SHIRAISHI, A.; MIURA, A.; KAKUTANI, T. Control of genic DNA methylation by a jmjC domain-containing protein in *Arabidopsis thaliana*. **Science**, Washington, v. 319, p. 462-465, 2008.

SCHIMIDT, T. LINEs, SINEs and repetitive DNA: non-LTR retrotransposons in plant genomes. **Plant Molecular Biology**, v. 40(6), p.903-10.

SCHOOF, H.; LENHARD, M.; HAECKER, A.; MAYER, K.F.X.; JÜRGENS, G.; LAUX, T. The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. **Cell**, Cambridge, v. 100, p. 635-644, 2000.

SHARMA, V.K.; RAMIREZ, J.; FLETCHER, J.C. The *Arabidopsis* CLV3-like (CLE) genes are expressed in diverse tissues and encode secreted proteins. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 51, p. 415-425, 2003.

SLOTKIN, R.K.; MARTIENSSEN, R. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. **Nature Review of Genetics**, v. 8, p. 272–85, 2007.

SILVAROLLA, M.B. Plant genomic alterations due to tissue culture. **Journal of Brazilian Association Advanced Science**, São Paulo, v. 44, p. 329-335, 1992.

SINGER, T.; YORDAN, C.; MARTIENSSEN, R.A. Robertson's *mutator* transposons in *A. thaliana* are regulated by the chromatin-remodeling gene decrease in DNA methylation (DDM1). **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 15, p. 591-602, 2001.

SMITH, G. R.; FORD, R.; FRENKEL, M. J.; SHUKLA, D. D.; DALE, J. L. Transient expression of the coat protein of sugarcane mosaic virus in sugarcane protoplasts and expression in *Escherichia coli*. **Arch. Virol.**, v. 125, p. 15-23, 1992.

SMYTH, D.R. Plant retrotransposons. In VERMA, D.P.S. ed Control of plant gene expression. Boca Raton, USA, CRC Press, p. 1-15, 1993.

SNYMAN, S.J.; HUCKETT, B.I.; BOTHA, F.C.; WATT, M.P. A comparison between direct and indirect somatic morphogenesis for the production of transgenic sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids). **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 560, p. 105-108, 2001.

SNYMAN, S.J.; WATT, M.P.; HUCKETT, B.I.; BOTHA, F.C. Direct somatic embryogenesis for rapid, cost effective production of transgenic sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids). **Proceedings of South Africa Sugar Technology Association**, Mount Edgecombe, v. 74, p. 186-187, 2000.

SNYMAN, S.J.; MEYER, G.M.; RICHARDS, J.M.; HARICHARAN, N.; RAMBAREEB, S.; HUCKETT, B.I. Refining the application of direct embryogenesis in sugarcane: effect of the development phase of leaf disk explants and the timing of DNA transfer on transformation efficiency. **Plant Cell Reports**, New York, v.25, p. 1016-1023, 2006.

TADESSE, Y.; SAGI, L.; SWENNEN, R.; JACOBS, M. Optimisation of transformation conditions and production of transgenic sorghum (*Sorghum bicolor*) via microparticle bombardment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.75, p.1-18, 2003.

TAKEDA, S.; SUGIMOTO, K.; OTSUKI, H.; HIROCHIKA, H. A 13-bp cis-regulatory element in the LTR promoter of the tobacco retrotransposon *Tto1* is involved in responsiveness to tissue culture, wounding, methyl jasmonate and fungal elicitors. **The Plant Journal**, Oxford, v. 18, p. 383-393, 1999.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (mega) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, CHICAGO, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TAYLOR, P.W.J.; KO, H.L.; ADKINS, S.W.; RATHUS, C.; BIRCH, R.G. Establishment of

embryogenic callus and high protoplast yielding suspension cultures of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 28, p. 69-78, 1992.

TAYLOR, P.W.J.; GEIJSKES, J.R.; KO, H.L.; FRASER, T.A.; HENRY, R.J.; BIRCH, R.G. Sensitivity of random amplified polymorphic DNA analysis to detect genetic change in sugarcane during tissue culture. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.90, p. 1169–1173, 1995.

TEE, C.S.; MAZIAH, M. Optimization of biolistic bombardment parameters for *Dendrobium* Sonia 17 calluses using GFP and GUS as the reporter system. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 80, p. 77-89, 2005.

TEIXEIRA, F.K.; HEREDIA, F.; SARAZIN, A.; ROUDIER, F.; BOCCARA, M.; CIAUDO, C.; CRUAUD, C.; POULAIN, J.; BERDASCO, M.; FRAGA, M.F.; VOINNET, O.; WINCKER, P.; ESTELLER, M.; COLOT, V. A role for RNAi in the selective correction of dna methylation defects. **Science**, Washington, v. 323, p. 1600-1604, 2009.

THOMPSON, J.D; HIGGIN, S.D.G; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TSUKAHARA, S.; KOBAYASHI, A.; KAWABE, A.; MATHIEU, O.; MIURA, A.; KAKUTANI, T. Bursts of retrotransposition reproduced in Arabidopsis. **Nature**, London, v. 461, p. 423-427, 2009.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. Disponível em: <<http://www.portalunica.com.br>>. Acesso em: 06 jun. 2010.

VETTORE, A.L.; DA SILVA, F. R.; KEMPER, E. L.; SOUZA, G. M.; DA-SILVA, A. M.; FERRO, M. I. T.; HENRIQUE-SILVA, F.; GIGLIOTI, E. A.; LEMOS, M. V. F.; COUTINHO, L. L.; NOBREGA, M. P.; CARRER, H.; FRANCA, S. C.; BACCI, M. (JR); GOLDMAN, M. H. S.; GOMES, S. L.; NUNES, L. R.; CAMARGO, L. E. A.; SIQUEIRA, W. J.; VAN-SLUYS, M. A.; THIEMANN, O. H.; KURAMAE, E. E.; SANTELLI, R. V.; MARINO, C. L.; TARGON, M. L. P. N.; FERRO, J. A.; SILVEIRA, H. C. S.; MARINI, D. C.; LEMOS, E. G. M.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; TAMBOR, J. H. M.; CARRARO, D. M.; ROBERTO, P. G.; MARTINS, V. G.; GOLDMAN, G. H.; DE-OLIVEIRA, R. C.; TRUFFI, D.; COLOMBO, C. A.; ROSSI, M.; DE-ARAUJO, P. G.; SCULACCIO, S. A.; ANGELLA, A.; LIMA, M. M. A.; DE-ROSA, V. E. (JR); SIVIERO, F.; COSCRATO, V. E.; MACHADO, M. A.; GRIVET, L.; DI- MAURO, S. M. Z.; NOBREGA, F. G.; MENCK, C. F. M.; BRAGA, M. D. V.; TELLES, G. P.; CARA, F. A. A.; PEDROSA, G.; MEIDANIS, J.; ARRUDA, P. Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 13, p. 2725–2735, 2003.

- VICKERS, J.E.; GROF, C.P.L.; BONNETT, G.D.; JACKSON, P.A.; MORGAN, T.E. Effects of tissue culture, biolistic transformation and introduction of PPO and SPS gene constructs on performance of sugarcane clones in the field. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 56, p. 57-68, 2005.
- VOLLBRECHT, E.; REISER, L.; HAKE, S. Shoot meristem size is dependent on inbred background and presence of the maize homeobox gene, *knotted1*. **Development**, NY, v. 127, p. 3161-3172, 2000.
- VONGS, A.; KAKUTANI, T.; MARTIENSSEN, R.A.; RICHARDS, E.J. *Arabidopsis thaliana* DNA methylation mutants. **Science**, Washington, v. 260, p. 1926-1928, 1993.
- WEI, H.; MOORE, P.H.; ALBERT, H.H. Comparative expression analysis of two sugarcane polyubiquitin promoters and flanking sequences in transgenic plants. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 160, p. 1241-1251, 2003.
- WILLIAMS, L.; FLETCHER, J.C. Stem cell regulation in the *Arabidopsis* shoot apical meristem. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 8, p. 582-586, 2005.
- XU, L.P.; QUE, Y.X.; XU, J.S.; FANG, S.-R.; ZHANG, M.Q.; CHEN, Y.Q.; CHEN R.K. Establishment of genetic transformation system and obtaining transgenic sugarcane (var. badila) transformed with *rs* gene. **Sugar Technology**, Amsterdam, v. 10, n. 2, p. 128-132, 2008.
- YAMAKAWA, S.; MATSUBAYASHI, Y.; SAKAGAMI, Y., KAMADA, H., SATOH, S. Promotive effects of the peptidyl plant growth factor, phytosulfokine- α , on the growth and chlorophyll content of *Arabidopsis* seedlings under high night-time temperature conditions. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v. 63, p.2240–43, 1999.
- YANG, H.; MATSUBAYASHI, Y.; NAKAMURA, K.; SAKAGAMI, Y. *Oryza sativa* PSK gene encodes a precursor of phytosulfokine- α , a sulfated peptide growth factor found in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washingto, v. 96, p. 13560–13565, 1999.
- YANG, M.; BOWER, R.; BUROW, M.D.; PATERSON, A.H.; MIRKOV, T.E. A rapid and direct approach to identify promoters that confer high-levels of gene expression in monocots. **Crop Science**, Madison, v. 43, p. 1805-1813, 2003.
- ZHANG, L.; XU, J.; BIRCH, R.G. Engineered detoxification confers resistance against a pathogenic bacterium. **Nature biotechnology**, New York, Amsterdam, v. 128, p. 59-65, 1997.
- ZILBERMAN, D.; GEHRING, M.; TRAN, R.K.; BALLINGER, T.; HENIKOFF, S. Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. **Nature Genetics**, v. 39(1), p. 61-9, 2007.

ZUCCHI, M.I.; ARIZONO, H.; MORAIS, V.A.; FUNGARO, M.H.P.; VIEIRA, M.L.C.
Genetic instability of sugarcane plants derived from meristem cultures. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, p. 91-96, 2002.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)