TRANSFORMAÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA RESISTÊNCIA AO HERBICIDA GLUFOSINATO DE AMÔNIO, VIA BIOLÍSTICA

MARIA CRISTINA FALCO

Engenheira Agrônoma

Orientador: Prof. Dr. Augusto Tulmann Neto

**Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Doutor
em Agronomia, Área de Concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas.**

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Janeiro/1998

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Falco, Maria Cristina

Transformação de cana-de-açúcar para resistência ao herbicida Glufosinato de amônio, via biolística / Maria Cristina Falco. - - Piracicaba, 1998.
129 p. : il.

Tese (doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1998.
Bibliografia.

1. Biolística 2. Calo embriogênico 3. Cana-de-açúcar 4. Engenharia genética 5. Melhoramento genético vegetal 6. Planta transgênica 7. Resistência ao herbicida 8. Transformação genética I. Título

CDD 633.61

TRANSFORMAÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA RESISTÊNCIA AO HERBICIDA GLUFOSINATO DE AMÔNIO, VIA BIOLÍSTICA

MARIA CRISTINA FALCO

Aprovada em: 05.03.1998

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Augusto Tulmann Neto

CENA/USP

Dr. Eugênio César Ulian

COPERSUCAR

Prof. Dr. Márcio de Castro Silva Filho

ESALQ/USP

Dr. Mariângela Cristofani

CCSM/IAC

Prof. Dr. Antônio Vargas de Oliveira Figueira

CENA/USP

Prof. Dr. AUGUSTO TULMANN NETO

Orientador

Dedicada a Wanderlei

Agradecimentos

Ao Dr. Augusto Tulmann Neto, pela orientação, amizade e confiança ao longo dos últimos 10 anos.

Ao Dr. Eugênio César Ulian, pela orientação e amizade e por ter possibilitado a realização deste trabalho junto à Copersucar.

Ao Laboratório da Seção de Biologia Molecular do Centro de Tecnologia Copersucar, nas pessoas de Carlos Gonzaga de Almeida, Jorge Alberto G. da Silva e Daniella P. Vianna Braga, pela amizade e transmissão de conhecimentos que permitiram a conclusão deste trabalho. À Rosângela, Andréa, Daniela, Eugênio Benoni e a todos os demais funcionários que direta ou indiretamente contribuíram.

Ao CENA/USP, em especial à Seção de Biologia Celular, pela cessão do laboratório e pela agradável convivência ao longo de tantos anos. Aos funcionários Inês F. P. Rodrigues, Paulo Cassieri, Wlamir de A. Godoy e José Benedito Alves, pelo apoio durante o trabalho.

Aos colegas do curso de Pós-graduação do Departamento de Genética, pelo companheirismo, em especial a Maria Imaculada e Gilberto.

Ao Departamento de Genética da ESALQ/USP e a todos os professores pelos conhecimentos transmitidos, em especial ao Prof. Márcio de Castro Silva Filho, pelas valiosas sugestões nas análises moleculares.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Núcleo de Apoio à Pesquisa - Microscopia Eletrônica na Pesquisa Agropecuária (NAP-MEPA, ESALQ/USP) e à Dr. Adriana Rodriguez, pela amizade e valiosa ajuda na Microscopia.

À Maria Cândida e Gilberto, pelo auxílio com a documentação fotográfica.

Ao Wanderlei, minha família e amigos, por todo apoio e compreensão que tiveram durante a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
Lista de Figuras	vii
Lista de Tabelas	xiii
Lista de Abreviaturas	xiv
Resumo	xv
Summary	xviii
 1. INTRODUÇÃO	 1
 2. REVISÃO DE LITERATURA	 4
2.1. A cultura da cana-de-açúcar	4
2.2. Transformação genética	8
2.2.1. Transformação genética em cana-de-açúcar	9
2.3. A biolística	12
2.3.1. Escolha do alvo	12
2.3.2. Condições de bombardeamento	14
2.3.3. Processo de seleção de transformantes	16
2.3.4. Escolha do promotor	19
2.3.5. Escolha do transgene de interesse	20
2.3.6. Co-transformação	22
2.4. Silenciamento de transgenes	23
2.4.1. A influência do estágio celular no processo de transformação ...	25
2.4.2. O “efeito de posição”	26
2.4.3. Co-supressão e epistasia	27
2.5. Análises moleculares	31
2.5.1. Presença e estrutura do transgene	32
2.5.2. Hibridização Southern	33
2.5.3. Expressão do transgene	34

3. MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1. Material vegetal	37
3.2. Obtenção de calos	38
3.3. Escolha da fase de subcultivo para bombardeamento	38
3.4. Otimização de parâmetros	39
3.4.1. Distância do alvo	42
3.4.2. Pressão de disparo	43
3.4.3. Quantidade de DNA	43
3.5. Determinação da estabilidade da expressão GUS	45
3.6. Análise microscópica do material bombardeado	45
3.6.1. Microscopia ótica	45
3.6.2. Microscopia eletrônica de varredura	46
3.7. Escolha da dose seletiva de genética	46
3.8. Co-transformação	47
3.8.1. Teste com genética	49
3.8.2. Teste com kanamicina	50
3.8.3. Teste com glufosinato de amônio	52
3.9. Multiplicação "in vitro" das plantas resistentes	52
3.10. Análises Moleculares	53
3.10.1. Confirmação da presença dos genes (Southern)	57
3.10.2. Estimativa do número de cópias inseridas (Southern)	61
3.10.3. Transcrição do gene <i>bar</i> (RT-PCR)	61
3.10.4. Expressão do gene <i>neo</i> (Western blot)	66
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4.1. Escolha da fase de cultivo de calos para bombardeamento	69
4.2. Otimização de parâmetros	70
4.2.1. Distância do alvo	71
4.2.2. Pressão de disparo	73
4.2.3. Quantidade de DNA	74
4.3. Estabilidade da expressão GUS	76

4.4. Análise microscópica	78
4.5. Seleção em meio de cultura contendo geneticina	82
4.6. Co-transformação	87
4.7. Análises moleculares	93
4.7.1. Confirmação da presença dos genes (Southern blot)	95
4.7.2. Estimativa do número de cópias inseridas no genoma	101
4.7.3. Análise da expressão do gene <i>neo</i> (Western blot)	109
4.7.4. Análise da expressão do gene <i>bar</i> (RT-PCR)	111
4.8. Discussão geral	113
5. CONCLUSÕES	118
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Acelerador de micropartículas utilizado para introdução de genes em calos de cana-de-açúcar, desenvolvido no Centro de Tecnologia Copersucar, segundo instruções de <i>Finer et al.</i> (1992), combinando gás Hélio comprimido e vácuo parcial.	40
Figura 2 Esquema representativo do plasmídio pAHC27 (gentilmente cedido pelo Dr. Peter H. Quail do USDA/ARS Plant Gene Expression Center, Albany, Califomia, EUA), que contém o promotor da ubiquitina do milho (<i>ubi-1</i>) e o gene repórter da β -glucuronidase: <i>uid-A</i> (GUS).	41
Figura 3 Calo embriogênico de cana-de-açúcar, clone SP80-180, expressando o gene da β -glucuronidase (<i>uid-A</i>). Cada ponto azul, independente do tamanho ou intensidade, foi considerado um ponto de expressão GUS, nos experimentos de otimização de parâmetros.	44
Figura 4 Esquema representativo do plasmídio pHA9 (gentilmente cedido pelo Dr. Henrik Albert do Hawaian Agricultural Research Center, Honolulu, Hawaii, EUA), que contém o promotor da ubiquitina do milho (<i>ubi-1</i>), representado pelo bloco em negrito, e o gene que codifica para neomicina fosfotransferase (<i>neo</i>).	48
Figura 5 Esquema representativo do plasmídio pAHC20 (gentilmente cedido pelo Dr. Peter H. Quail do USDA/ARS Plant Gene Expression Center, Albany, Califomia, EUA), que contém o promotor da ubiquitina do milho (<i>ubi-1</i>), representado pelo bloco em negrito, e o gene que codifica para fosfinotricina acetiltransferase (<i>bar</i>).	48
Figura 6 Teste foliar em casa de vegetação com o antibiótico kanamicina, aplicado diretamente sobre ferimento no limbo foliar, na concentração de 1%, em plantas de cana-de-açúcar, clone SP80-180, transformadas por biolística. O antibiótico é aplicado em papel absorvente sobre o ferimento e envolvido por um filme plástico para evitar evaporação e garantir a penetração.	51

Figura 7	Resumo do sistema de obtenção da primeira fita de cDNA, para ser posteriormente amplificada por PCR (Kit SuperScript TM , Gibco BRL).	64
Figura 8	Otimização da distância do alvo para biolística em calos de cana-de-açúcar, clone SP80-180.	72
Figura 9	Otimização da pressão de disparo para biolística em calos de cana-de-açúcar, clone SP80-180.	73
Figura10	Otimização da quantidade de DNA para biolística em calos de cana-de-açúcar, clone SP80-180.	74
Figura11	Diminuição da expressão GUS ao longo do tempo, em calos bombardeados de cana-de-açúcar, clone SP80-180.	76
Figura12	Localização, através de microscopia ótica com historesina, dos microprojéteis de tungstênio em células de calo embriogênico de cana-de-açúcar, clone SP80-180, bombardeado nas seguintes condições: distância de 11 cm da fonte, pressão de 8 Kgf/cm ² . A. Aumento de 200x. Observar localização das partículas na periferia do calo. B. Aumento de 320x. A seta indica uma célula com cerca de 18 partículas inseridas.	79
Figura13	Microscopia Eletrônica de Varredura. A. Detalhe da presença de possíveis microprojéteis na superfície de células de calos de cana-de-açúcar, clone SP80-180, após bombardeamento (aumento de 2000x). B. Provável orifício na parede celular, provocado por microprojétil (aumento de 3400x).	81
Figura14	Avaliação do teste de sensibilidade de calos embriogênicos de cana-de-açúcar, clone SP80-180, ao antibiótico geneticina. A. Primeira avaliação, realizada 15 dias após a introdução de calos em meio seletivo. B. Segunda avaliação, realizada após 30 dias. .	83

Figura15	Sensibilidade de calos embriogênicos de cana-de-açúcar, clone SP80-180, ao antibiótico geneticina.	84
Figura16	Regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos de cana-de-açúcar, clone SP80-180, em meio de cultura contendo geneticina.	85
Figura17	Resultado de aplicação de herbicida glufosinato de amônio (produto comercial Finale) em plantas transformadas de cana-de-açúcar, clone SP80-180. À esquerda, plantas que não apresentaram resistência. À direita, plantas transgênicas para o gene <i>bar</i>	92
Figura18	Análise Southern para certificar-se da presença do gene <i>neo</i> em plantas transformadas de cana-de-açúcar, clone SP80-180. As amostras de DNA genômico foram clivadas com a enzima de restrição <i>EcoRI</i> , gerando um fragmento contendo o gene de interesse de aproximadamente 1,7 kb. O gene <i>neo</i> , com 844 pb, extraído do plasmídio pHA9, foi utilizado como sonda na hibridização. A coluna T refere-se à testemunha não transformada. As colunas de 1 a 20 correspondem às plantas que foram bombardeadas. Com exceção da planta 2, todas as demais apresentaram o gene <i>neo</i> inserido no genoma (indicado pela seta). ..	96
Figura19	Análise Southern para certificar-se da presença do gene <i>neo</i> em plantas regeneradas por micropropagação de plantas transformadas. Clivagem com a enzima de restrição <i>EcoRI</i> , gerando fragmento com o gene <i>neo</i> de aproximadamente 1,7 kb. O gene <i>neo</i> , com 844 pb, extraído do plasmídio pHA9, foi utilizado como sonda na hibridização. A coluna P refere-se ao plasmídio pHA9. A coluna T refere-se à testemunha não transformada. As colunas 6, 10, 14, 17, 19 e 20 referem-se às plantas transformadas originais e as demais, posicionadas em sequência à direita, são as regenerantes de 3 ciclos de micropropagação. A seta indica a presença do gene. Maiores detalhes podem ser obtidos no texto.	97

Figura20 Análise Southern para certificar-se da presença do gene *bar* em plantas transformadas de cana-de-açúcar, clone SP80-180. As amostras de DNA genômico foram clivadas com a enzima de restrição *EcoRI*, gerando um fragmento contendo o gene de interesse de aproximadamente 1,5 kb. O gene *bar*, com 562 pb, extraído do plasmídio pAHC20, foi utilizado como sonda na hibridização. A coluna T refere-se à testemunha não transformada. As colunas de 1 a 20 referem-se às plantas bombardeadas com o gene *bar*. A seta indica o fragmento contendo o gene de interesse.

98

Figura21 Análise Southern para detectar a presença do gene *bar* em plantas obtidas por micropropagação de plantas transformadas. Clivagem com a enzima de restrição *EcoRI*, gerando fragmento com o gene *bar* de aproximadamente 1,5 kb. O gene *bar*, com 562 pb, extraído do plasmídio pAHC20, foi utilizado como sonda na hibridização. A coluna P refere-se ao plasmídio pAHC20. A coluna T refere-se à testemunha não transformada. As colunas 6, 10, 14, 17, 19 e 20 referem-se às plantas transformadas originais e as demais, posicionadas em sequência à direita, são as regenerantes de 3 ciclos de micropropagação. A seta indica a presença do gene. Maiores detalhes podem ser obtidos no texto.

99

Figura22 Análise Southern para estimar o número de cópias do gene *neo* que foram inseridas nas plantas transformadas. Amostras de DNA genômico foram clivadas com as enzimas de restrição *HindIII* (H) e *BglII* (Bg), gerando fragmentos de tamanhos imprevisíveis, já que estas enzimas clivam o vetor em apenas um sítio de restrição. O gene *neo*, com 844 pb, extraído do plasmídio pHA9, foi utilizado como sonda na hibridização. A coluna T refere-se à testemunha não transformada. As colunas duplas de 1 a 20 referem-se às plantas transformadas. A planta número 2 não apresentou a banda correspondente ao gene. A estimativa do número de cópias inseridas foi a mesma nos dois padrões enzimáticos. As plantas 4 e 5 tiveram inserção de uma cópia, as plantas 1, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 16, 17, 18, 19 e 20 tiveram duas cópias, e as plantas 3, 12, 13 e 15 tiveram três cópias inseridas. .

103

Figura23	Análise Southern para estimar o número de cópias do gene <i>neo</i> inseridas no genoma de plantas obtidas por micropropagação de plantas transformadas. As amostras do DNA genômico foram clivadas com a enzima de restrição <i>HindIII</i> , que cliva o vetor em apenas um sítio de restrição, gerando assim, fragmentos de tamanhos imprevisíveis. O gene <i>neo</i> , com 844 pb, extraído do plasmídio pHA9, foi utilizado como sonda na hibridização. A coluna T refere-se à testemunha não transformada. As colunas 6, 10, 14, 17, 19 e 20 referem-se às plantas transformadas originais e as demais, posicionadas em sequência à direita, são as regenerantes de 3 ciclos de micropropagação. Todas as plantas apresentaram uma estimativa de duas cópias inseridas. A seta indica fragmentos de aproximadamente 6 kb, que se aproximam do tamanho do vetor (5,7 kb).	105
Figura24	Análise Southern para estimar o número de cópias do gene <i>bar</i> que foram inseridas no genoma de plantas transformadas. Amostras do DNA genômico foram clivadas com as enzimas de restrição <i>HindIII</i> (H) e <i>BamHI</i> (Ba), gerando fragmentos de tamanhos imprevisíveis, já que estas enzimas clivam o vetor em apenas um sítio de restrição. O gene <i>bar</i> , com 562 pb, extraído do plasmídio pAHC20, foi utilizado como sonda na hibridização. A coluna T refere-se à testemunha não transformada. As colunas duplas de 1 a 20 referem-se às plantas transformadas. A estimativa do número de cópias inseridas foi a mesma nos dois padrões de restrição. As plantas 3, 12, 13 e 15 tiveram três cópias inseridas. As demais, apresentaram duas cópias, sendo que as plantas 4, 5 e 8 apresentaram padrões diferentes das demais. Maiores detalhes são encontrados no texto.	107

- Figura25** Análise Southern para estimar o número de cópias do gene *bar* inseridas no genoma de plantas obtidas por micropropagação de plantas transformadas. As amostras do DNA genômico foram digeridas com a enzima de restrição *HindIII*, que cliva o vetor em apenas um sítio de restrição, gerando assim, fragmentos de tamanhos imprevisíveis. O gene *bar*, com 562 pb, extraído do plasmídio pAHC20, foi utilizado como sonda na hibridização. A coluna T refere-se à testemunha não transformada. As colunas 6, 10, 14, 17, 19 e 20 referem-se às plantas transformadas originais e as demais, posicionadas em sequência à direita, são as regenerantes de 3 ciclos de micropropagação. Todas as plantas apresentaram uma estimativa de duas cópias inseridas. A seta indica fragmentos de aproximadamente 6 kb, que se aproxima do tamanho do vetor (5,6 kb). 108
- Figura26** Análise Western para comprovar a expressão do gene *neo* a nível de proteínas, em plantas transformadas de cana-de-açúcar, clone SP80-180. A linha M representa o marcador de médio peso molecular. A linha B corresponde à bactéria DH5 α , onde o plasmídio pHA9 foi clonado. A coluna T corresponde à testemunha não transformada. As demais referem-se a plantas transformadas, com exceção da planta 2 que, comprovando as análises Southern, não teve o gene *neo* incorporado ao genoma. A seta indica a proteína neomicina fosfotransferase (NPT-II), de aproximadamente 29 ku. 110
- Figura27** Análise RT-PCR em plantas transformadas de cana-de-açúcar, clone SP80-180, para comprovar a expressão do transgene *bar* a nível de transcrição em mRNA. A coluna M corresponde ao marcador molecular pGem. A coluna P representa o controle positivo - o plasmídio pAHC20. A coluna T refere-se à testemunha não transformada. As demais referem-se a plantas transformadas. A seta indica fragmento de aproximadamente 0,3 kb, correspondente ao gene *bar*. 112

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Escolha da fase de subcultivo para bombardeamento de calos de cana-de-açúcar, clone SP80-180.	70
Tabela 2	Parâmetros otimizados em biolística para cana-de-açúcar, clone SP80-180.	77
Tabela 3	Resumo dos experimentos de co-transformação do clone SP82-3721.	89
Tabela 4	Resumo dos experimentos de co-transformação do clone SP80-180.	90

LISTA DE ABREVIATURAS

DEPC	Diethyl Pyrocarbonate
dNTPs	Deoxyribonucleosides Triphosphate (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
DTM	Tris-HCl 250mM, MgCl ₂ 25 mM, β-mercaptoethanol 50 mM
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etilene Diamine Tetra-acetate
HEPES	N-[2-Hidroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethane sulfonic acid])
NEB	Na Acetate 12,5 mM, EDTA 1mM, Tris 100 mM
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SSC	Saline - Sodium Citrate (tampão)
TAE	Tampão Tris-acetato / EDTA
TBE	Tampão Tris-borato / EDTA
TE	Tampão Tris / EDTA
TEMED	N, N, N', N' - tetra - methylethylenediamine
TRIS	(Hydroxymethyl) Aminomethane

TRANSFORMAÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA RESISTÊNCIA AO HERBICIDA GLUFOSINATO DE AMÔNIO, VIA BIOLÍSTICA

Autora: MARIA CRISTINA FALCO

orientador: Prof. Dr. AUGUSTO TULMANN NETO

co-orientador: Dr. EUGÊNIO CÉSAR ULIAN

Resumo

Estabeleceu-se um sistema de transformação de plantas a partir de biolística em calos embriogênicos de dois clones nacionais de cana-de-açúcar, SP80-180 e SP82-3721.

Após experimento para obtenção de quantidade suficiente de calos embriogênicos derivados de segmentos transversais de folhas jovens, foram otimizados parâmetros como distância do alvo, pressão de disparo e quantidade de DNA, em aparelho de biolística desenvolvido pelo Centro de Tecnologia Copersucar, segundo modelo descrito por FINER *et al.* (1992). Para isso, calos embriogênicos foram bombardeados com o vetor pAHC27, que contém o gene repórter *uid-A* (*gus*). Análises histoquímicas com o substrato X-gluc foram realizadas para determinação dos melhores níveis de expressão.

Microscopia ótica e eletrônica de varredura foram realizadas para melhor compreender a introdução das partículas nas células.

Calos embriogênicos em fase R2 (resultantes de dois ciclos de seleção) foram utilizados para determinar a sensibilidade do explante ao antibiótico geneticina, que seria utilizado em meio seletivo para seleção dos transformantes.

Vários experimentos de co-transformação, utilizando os plasmídios pHA9 (que contém o gene de resistência a antibióticos aminoglicosídicos, como kanamicina e geneticina) e pAHC20 (que contém o gene de resistência ao herbicida glufosinato de amônio), foram realizados com os dois clones.

Após seleção de calos transformados e regeneração de plantas em meio seletivo contendo geneticina (30 mg/L), as possíveis plantas transgênicas foram transferidas para casa de vegetação.

Teste fenotípico para resistência ao antibiótico foi realizado em casa de vegetação, com aplicação do antibiótico kanamicina (1%) diretamente sobre ferimento em limbo foliar.

O herbicida comercial Finale foi aplicado em duas pulverizações sobre as plantas que se mostraram resistentes ao antibiótico. As plantas resistentes foram consideradas co-transformadas.

Parte das plantas co-transformadas foram submetidas a análises moleculares para confirmação da co-transformação.

Hibridizações Southern foram realizadas para detectar a presença dos genes no genoma e estimar o número de cópias inseridas. Também foram analisadas plantas obtidas por micropropagação das plantas transformadas para verificar a manutenção do status transgênico.

Análises de expressão dos transgenes foram realizadas por dois métodos diferentes: imunoensaio Western blot para proteína NPT-II, e RT-PCR para RNA transcrito do gene *bar*.

O presente sistema possibilitou a obtenção de plantas transformadas de cana-de-açúcar em cerca de 200 dias e provavelmente será adaptável para introdução de outros genes de interesse agrônômico que já estão sendo estudados para a cultura.

GENETIC TRANSFORMATION OF SUGARCANE FOR THE HERBICIDE AMMONIUM GLUFOSINATE USING THE BIOLISTIC METHOD

Author: MARIA CRISTINA FALCO

Adviser: PROF. DR. AUGUSTO TULMANN NETO

Co-Adviser: Dr. EUGÊNIO CÉSAR ULIAN

Summary

A sugarcane genetic transformation system was established using embryogenic callus of two Brazilian clones: SP80-180 and SP82-3721.

Embryogenic calli obtained from culture of cross sections of young leaves were bombarded to optimize parameters such as target distance, helium pressure and amount of DNA. The experiments used a biolistic apparatus developed by Copersucar Technology Center according to a model described by *Finer et al.* (1992). Plasmid pAHC27 was used as a vector containing the *uid-A* reporter gene. Histochemical analysis with X-gluc substrate were done to investigate to determine the best expression levels.

Light and scanning electron microscopy were conducted to investigate the particle insertion into cells.

Embriogenic callus was used to determine explant sensitivity to the antibiotic geneticin, used to select transformed tissue.

Several cotransformation experiments were done with two sugarcane genotypes using plasmid pHA9 (containing a gene for resistance to aminoglycosidic antibiotics such as kanamycin and geneticin) and pAHC20 (containing a gene for resistance to the herbicide ammonium glufosinate).

After selection of transformed callus and plant regeneration in selective medium containing 30 mg/l geneticin, the putative transgenic plants were transferred to the greenhouse.

A phenotypical test for antibiotic resistance was performed in the greenhouse with the application of a 1% kanamycin solution on a wound made in the leaf surface.

A commercial formulation of ammonium glufosinate was sprayed twice on plants that showed resistance to the antibiotic. Resistant plants were considered to be cotransformed.

Some of the cotransformed plants were submitted to molecular analysis to confirm their transformation status.

Southern blots were done to detect the presence of the genes in the plants' genome and to determine the number of copies inserted. Micropropagated transformed plants were also analyzed to determine stability of the insertions.

Gene expression in the transformants was analyzed by two different methods: Western blot for the antibiotic resistance gene and RT-PCR for the herbicide resistance gene.

This system allowed the recovery of transformed sugarcane plants in 200 days and will probably allow the introduction of other genes of agronomic interest in other varieties of this important crop.

1. INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar no Brasil possui importância histórica, econômica, social e política. A indústria sucro-alcooleira viveu um de seus maiores momentos quando o álcool passou a ser utilizado como combustível de automotivos, incentivado pelo Programa Nacional do Álcool - o Pró-Álcool - criado em 75/76. Nesta época, a produção de álcool anidro equivalente no Brasil era de 600 mil m³/ano. Em 1985, no auge do programa, 96% da frota automobilística produzida no país possuía motores movidos a álcool. Na safra de 91/92, a produção de álcool anidro equivalente atingiu 12,3 milhões de m³/ano e continuou neste patamar até a safra de 95/96. Mas, a despeito de todo o sucesso, o programa foi abandonado e hoje está à deriva, com breves e raros boatos de reativação.

Apesar da retração registrada na demanda de veículos a álcool, mais de 4 milhões de veículos da frota brasileira ainda são movidos por este combustível e 22% da gasolina nacional é, por força de lei, constituída de álcool anidro (JOSEPH JUNIOR, 1997).

A análise dos dados de produção da agroindústria do açúcar e do álcool no Brasil revelou que, no período entre 1970/71 e 1995/96, ocorreram significativos avanços no desempenho do setor, em termos de produtividade de cana e rendimento de açúcar e álcool. Constatou-se que os aumentos de tonelagem de cana ocorreram com maior intensidade logo após a implantação do Pró-Álcool, em 1975/76, até meados dos anos 80. Após esse período, a produtividade de cana permaneceu estável no Brasil (FERNANDES, 1996).

Os progressos no melhoramento genético através de programas convencionais de cruzamentos são limitados pelas dificuldades genéticas da cultura. Os rearranjos ao acaso que ocorrem durante a meiose, fazem com que retrocruzamentos visando introdução de características específicas sejam impraticáveis. Isso faz com que muitos materiais altamente promissores sejam abandonados por apresentar pequenas mas importantes falhas, como por exemplo, a suscetibilidade a alguma doença.

Apesar disso, importantes variedades têm sido liberadas para cultivo, oriundas de programas de melhoramento de instituições como a Copersucar, o Instituto Agrônomo de Campinas e a UFSCar. O programa de melhoramento do Centro de Tecnologia Copersucar, por exemplo, já liberou para plantio comercial 36 variedades, sendo a primeira em 1983 e a última em 1997 (BRESSIANI *et al.*, 1997).

A transformação genética de plantas surgiu no final da década de 80, como uma solução bastante atrativa para problemas semelhantes ao citado acima. Passados a euforia inicial e o descrédito de muitos, verifica-se atualmente que, embora muitos problemas necessitem esforços concentrados, como o silenciamento de transgenes e a necessidade de promotores específicos, a técnica mostra-se viável.

Fatores como a dificuldade de transformação de monocotiledôneas por meio de *Agrobacterium*, a recalcitrância na regeneração de plantas a partir de protoplastos, a grande produção de calos embriogênicos facilmente regeneráveis e, finalmente, a facilidade de propagação vegetativa da espécie, fizeram com que a biolística, ou bombardeamento de micropartículas, se tornasse o método mais promissor para transformação de cana-de-açúcar.

As maiores possibilidades do uso da transformação têm surgido no campo de resistência a pragas e doenças. Genes isolados de *Bacillus thuringiensis*, inibidores de proteinases de insetos e genes de capa proteica de vírus, apresentam grande potencial no controle biológico.

Sucessos recentes em cana, como os alcançados pelo grupo de pesquisadores da Austrália, liderado por Robert G. Birch e pelos grupos americanos de Choudhury & Vasil (Flórida) e Gallo-Meagher & Irvine (Texas), incentivaram o Centro de Tecnologia Copersucar a desenvolver um aparelho para bombardeamento, seguindo modelo descrito por FINER *et al.* (1992), e adaptar a tecnologia para variedades nacionais.

Foi utilizando o apoio técnico e profissional do CTC - Copersucar, que este trabalho foi desenvolvido, objetivando otimizar parâmetros de bombardeamento e transformar plantas de cana-de-açúcar com os genes para resistência ao herbicida glufosinato de amônio (*bar*) e para resistência a antibióticos do grupo dos aminoglicosídeos (*neo*).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar, plantada em vários continentes do mundo, tanto em regiões de clima tropical como temperado, é a principal fonte de matéria prima para produção de açúcar, seguida pela beterraba. De mais de 100 países produtores, apenas 11 são responsáveis por cerca de 80% da produção total de cana-de-açúcar no mundo (MITSUI, 1995).

O Brasil produz cerca de um quarto de toda a cana mundial, seguido pela Índia, segundo maior produtor. A implantação do Programa Nacional do Alcool (Pró-Alcool), na década de 70, exigiu aumento na produção de álcool, sem prejuízo para o açúcar consumido no país. Esse objetivo foi alcançado inicialmente com o crescimento da área cultivada, principalmente na região Sudeste do país, transformando o Brasil no maior produtor mundial de cana-de-açúcar (FERNANDES, 1996).

Sob muitos aspectos, é inegável que o desenvolvimento da produção e do uso intensivo do álcool carburante foi um sucesso no Brasil. O Pró-Álcool que demandou investimentos de 12 bilhões de dólares, possibilitou a criação de 800 mil novos empregos e, até o final do ano passado, o uso do álcool carburante tinha permitido ao país economizar mais de 32 bilhões de dólares em divisas, dinheiro que teria sido gasto com a importação de petróleo e derivados se o programa não tivesse saído do papel. Na safra de 96/97 foram produzidos e consumidos, respectivamente 238 mil e 249 mil barris diários de álcool anidro equivalente; ou seja, há um empate entre a oferta e a procura, mas a produção não avança porque já não se montam carros equipados com motores a álcool. Se em 1985, de cada cem automóveis fabricados pela indústria automobilística brasileira, 96 eram movidos a álcool hidratado, hoje, os veículos saem da linha de produção equipados exclusivamente com motores a gasolina. Não há valorização do produto junto ao consumidor. Mas, apesar da retração registrada na demanda de veículos a álcool, o combustível ainda representa 41% - em volume equivalente de gasolina - do total de combustíveis consumidos pelos veículos equipados com motores de ciclo Otto. Mais de 4 milhões de veículos da frota brasileira ainda são movidos com o álcool hidratado e 22% da gasolina nacional é, por força de lei, constituída de álcool anidro (O QUE fazer com o Proálcool?, 1997).

Em 1995, a cana-de-açúcar ocupou o terceiro lugar em área plantada no país, o que corresponde a 9,8% da área cultivada. A produção obtida foi de mais de 300 milhões de toneladas, com um rendimento médio de 66,5 ton/ha (ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL, 1996). Embora seja o maior produtor mundial, a produtividade ainda está distante daquelas apresentadas por países como a Indonésia (cerca de 90 ton/ha), Filipinas e EUA (cerca de 80 ton/ha).

Dos 300 milhões de toneladas, mais da metade (cerca de 175 milhões de toneladas) foram obtidas no Estado de São Paulo, responsável também pelo segundo maior rendimento médio do país: 77,5 ton/ha, atrás apenas do Estado do Paraná, com 80 ton/ha.

A produção brasileira de açúcar cresceu 77% entre 1970 e 1983, passando de pouco mais de 5 milhões de toneladas para 9 milhões. A maior produção de açúcar no Brasil foi registrada na safra 94/95, com 11,933 milhões de toneladas (sendo mais da metade no Estado de São Paulo). Nos últimos 20 anos, a produção total de álcool no Brasil aumentou 18 vezes, enquanto a de açúcar aumentou 7 vezes.

Admite-se que os principais fatores responsáveis pelos melhores rendimentos foram a introdução de novas variedades de cana-de-açúcar na região Centro-Sul, como a NA56-79, nos anos 70 e as variedades SP produzidas pelo CTC a partir da década de 80, e os avanços no processo industrial (FERNANDES, 1996).

A maioria das variedades comerciais de cana-de-açúcar constitui-se de híbridos interespecíficos do gênero *Saccharum*, podendo ser descritos como aneuplóides complexos, devido ao alto grau de ploidia e à origem interespecífica de seus ancestrais. No melhoramento genético desta cultura prioriza-se aumento nos teores de sacarose, a resistência a doenças e a resistência ao florescimento precoce, que reduz a produção/(LIU, 1984).

Os programas de melhoramento clássico são dificultados pela poliploidia das espécies envolvidas, pela instabilidade dos cromossomos e pelo mosaicismo. Normalmente, trabalha-se com grandes populações segregantes que diminuem a eficiência de programas de cruzamentos. Embora exista um considerável número de variedades e clones com bom comportamento agrícola, limitações como

suscetibilidade a alguma doença, alta porcentagem de floração ou outra característica indesejada tornam tais variedades obsoletas. Isso porque a correção desses problemas através de retrocruzamentos é praticamente impossível para a cultura (PONCE, 1984).

Na cultura da cana-de-açúcar, a principal causa da substituição de variedades é a incidência de doenças. Os programas de melhoramento visam basicamente introduzir genes de resistência a doenças em novas variedades. Algumas epidemias no Brasil provocaram a substituição dos melhores cultivares. O mosaico na década de 20, o carvão nas décadas de 40 e 80 e a síndrome do amarelecimento foliar na década de 90, são as mais conhecidas (CASAGRANDE *et al.*, 1997).

A cultura de tecidos de cana-de-açúcar existe desde 1965 e desde então, estuda-se como esta ferramenta pode auxiliar em programas tradicionais de melhoramento. No início, a cultura de tecidos buscava formas de produzir, identificar, selecionar e avaliar variantes somaclonais e híbridos como métodos de desenvolver novas variedades. A micropropagação, a eliminação de doenças viróticas e a manutenção de germoplasma também foram objetivadas pela cultura de tecidos e, embora de eficiência comprovada, a aceitação foi reduzida devido aos altos custos associados. Com o advento da transformação genética de plantas através de técnicas diretas e indiretas, a cultura de tecidos finalmente ocupou posição de destaque, já que em praticamente todos os sistemas desenvolvidos, a base é a produção adequada de células alvo, seguida de regeneração de plantas transgênicas (MOORE, 1996).

2.2. Transformação Genética

A introdução de genes em plantas através da engenharia genética está se tornando uma técnica importante no melhoramento vegetal. Genes derivados de espécies não correlacionadas e até de outros reinos (bactérias, fungos e animais), que eram considerados inacessíveis para os melhoristas, podem, com esta nova tecnologia, ser introduzidos em seus programas de melhoramento (DE BLOCK, 1993).

A transformação genética mediada por *Agrobacterium* spp. é a estratégia mais comum para transformar plantas, por ser um sistema simples, eficiente e barato. Possui ainda a vantagem de produzir plantas transgênicas com um número limitado de cópias do(s) transgene(s), já que a inserção é geralmente um evento preciso (DE BLOCK, 1993). Porém, muitas espécies ou cultivares de cereais, pastagens, florestais e hortícolas têm se mostrado resistentes à transformação mediada por *Agrobacterium*. Infelizmente, para muitas dessas mesmas espécies, o isolamento e cultivo de protoplastos permanece difícil, impedindo a utilização de outros métodos de transformação que dependam dessa fase, como por exemplo, a eletroporação (BIRCH & FRANKS, 1991).

Dos métodos que utilizam DNA introduzido diretamente nas plantas, apenas dois são de importância prática: a eletroporação e a biolística (ou biobalística). O polietileno glicol (PEG) também foi utilizado com sucesso como agente mediador da incorporação de DNA em transformação de algumas espécies, mas a exigência de um sistema de protoplastos também fez com que o interesse por ele diminuísse. Em eletroporação, a permeabilidade da membrana e da parede celular é aumentada por pulsos elétricos, enquanto na biolística a alta velocidade de microprojéteis é utilizada

para carregar o DNA através de paredes celulares e membranas para dentro da célula (DE BLOCK, 1993).

Todo método de transformação direta faz uso de DNA plasmidial contendo os genes de interesse. Isso resulta em células transformadas que contêm, além dos genes de interesse, cópias fragmentadas de genes ou vetores em diferentes locais no genoma. Esta é uma das muitas diferenças entre o sistema de transformação com *Agrobacterium* e o sistema direto. A transformação com *Agrobacterium* resulta em uma integração mais precisa do DNA, que é definido pelas seqüências de borda do T-DNA. Outra grande diferença entre os dois sistemas é que *Agrobacterium* geralmente resulta em um número limitado de cópias integradas do transgene. Já na transformação direta é comum a ocorrência de muitas cópias, ligadas ou não (DE BLOCK, 1993).

Os dois métodos de transformação genética mais utilizados em monocotiledôneas têm sido a transferência direta de DNA em protoplastos isolados e a introdução de DNA via biolística (ZHOU *et al.*, 1995).

2.2.1. Transformação genética em cana-de-açúcar

As variedades comerciais de cana-de-açúcar são obtidas de esquemas de seleção que consomem de doze a quinze anos, nos quais os melhoristas identificam alguns clones elite a partir de uma grande população de “seedlings”. Estes clones muitas vezes são abandonados por apresentarem pequenos, mas importantes defeitos, como por exemplo a suscetibilidade a alguma doença. A correção destas falhas por meio de técnicas tradicionais de melhoramento é impraticável na cultura da

cana-de-açúcar, devido à sua complexidade genética e aos longos períodos necessários em cada ciclo de seleção para características de importância agronômica, como por exemplo a capacidade de enraizamento (BIRCH, 1996).¹ Todas estas limitações, aliadas à capacidade de rápida propagação vegetativa, tornaram a cana-de-açúcar uma cultura bastante conveniente para a aplicação de técnicas de transformação genética.

Dentre as mais utilizadas, a que melhor se aplica à cana-de-açúcar é, sem dúvida, a transformação direta via biolística; já que a transformação via *Agrobacterium* apresenta limitações em monocotiledôneas (as tentativas de transformar cana-de-açúcar utilizando *Agrobacterium* spp. não deram resultados positivos, embora algumas monocotiledôneas já tenham sido transformadas por este método) e a transformação direta de protoplastos encontra barreiras na capacidade de regeneração de plantas a partir destes (FALCO *et al.*, 1996a).

Outro fator favorável à aplicação desta técnica em cana-de-açúcar² é o eficiente sistema de regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos, que são ótimos alvos de bombardeamento. Este sistema possibilita a obtenção de material vegetal apropriado para experimentos de biolística em cerca de 70 dias, o que diminui a possibilidade de variação somaclonal, sem grandes problemas com quimerismo, comum quando são bombardeados tecidos com alto grau de organização. Em média, a cultura permanece na fase de calos por cerca de 150 dias e na fase de planta *in vitro* por mais 50 dias (BIRCH, 1996).

O desenvolvimento de um sistema eficiente de transformação genética abre caminho para o melhoramento da cana-de-açúcar a nível molecular, seja pela introdução de novos genes que possam corrigir falhas, como por exemplo, a

susceptibilidade a alguma doença; seja pelo bloqueio de genes que expressem características indesejáveis, como o excesso de fibras (BIRCH *et al.*, 1995).

O primeiro relato de transformação genética em cana-de-açúcar foi feito por CHEN *et al.* (1987), com a introdução do gene *cat* (cloranfenicol acetil transferase) em protoplastos, através de eletroporação e polietileno glicol, mas esbarraram na regeneração de plantas. Em 1991, FRANKS & BIRCH desenvolveram um sistema biolístico, transformaram calos e células em suspensão com o gene da β -glucuronidase, mas também não regeneraram plantas.

Em 1992, CHOWDHURY & VASIL transformaram calos e protoplastos para resistência à herbicida através do bombardeamento com microprojéteis e da eletroporação, respectivamente. Em ambos os casos não recuperaram plantas. No mesmo ano, BOWER & BIRCH obtiveram plantas de cana-de-açúcar transformadas com o gene *neo*, através do bombardeamento de calos embriogênicos.

SUN *et al.* (1993), no Hawai, conseguiram transformar plantas de *Saccharum spontaneum*, através da biolística, com os genes *neo*, *uid-A* e *bar*, que codifica a fosfinotricina acetil transferase, conferindo resistência ao herbicida glufosinato de amônio.

GAMBLEY *et al.* (1993) desenvolveram um sistema de transformação de cana-de-açúcar através da biolística, utilizando meristemas, com objetivo de diminuir problemas com variação somaclonal.

Um grupo de pesquisadores cubanos reportou que a eletroporação pode ser utilizada em cultura de células ou meristemas isolados, sem a passagem por protoplastos (ARENCIBIA *et al.*, 1992 e 1995). Se este trabalho for repetido em outros

laboratórios, certamente este será um dos métodos mais eficientes para transformação de cana-de-açúcar (MOORE, 1996).

2.3. A biolística

Embora a transformação de cana-de-açúcar através de bombardeamento com microprojéteis seja uma realidade, os procedimentos empregados no processo ainda estão longe de se tornarem rotina. Uma série de variáveis devem ser otimizadas antes de se optar por este método. Algumas das preocupações são: escolha do tecido alvo para receber o transgene, escolha do gene repórter para indicar que a inserção ocorreu, escolha do gene marcador seletivo e do meio seletivo para eliminar as células não transformadas, escolha do gene de interesse que codifica alguma característica agronômica e escolha do promotor para dirigir a expressão de cada gene (MOORE, 1996).

2.3.1. Escolha do alvo

De todos os alvos utilizados em bombardeamento de cana-de-açúcar, os calos embriogênicos são os mais comuns, apesar de apresentar maior probabilidade de variação somaclonal que tecidos meristemáticos (GAMBLEY *et al.*, 1994). Segundo estes autores, o processo de seleção não é considerado necessário para transformação de meristemas apicais, pois cada meristema terá no mínimo algumas células transformadas. Entretanto, ao transformar grandes blocos de tecidos, existe uma grande probabilidade de se obter quimeras de células transformadas e

células não transformadas que deverão ser segregadas para se conseguir transformantes sólidos.

Dentre as vantagens apresentadas pelos calos embriogênicos estão a sua facilidade de regenerar plantas em cana-de-açúcar, a facilidade de manuseio no processo de seleção em meio de cultura, a grande quantidade de material produzido para bombardeamento em curto espaço de tempo, e a diminuição do problema de quimerismo, comum quando se utiliza alvos mais organizados (BIRCH *et al.*, 1995).

Geralmente, dois tipos de calos são facilmente identificados em cana-de-açúcar: um nodular, compacto, não friável e com células de citoplasma denso, e outro mais friável, translúcido e com células grandes e vacuoladas. A regeneração de plantas ocorre preferencialmente no primeiro tipo, via embriogênese somática, embora também possa ocorrer via organogênese (FALCO *et al.*, 1996b).

BIRCH *et al.* (1995) alertam para o fato de que as variedades de cana-de-açúcar diferem entre si na facilidade de produzir calos embriogênicos. Uma das variedades estudadas pelos autores não produziu calos embriogênicos em quantidade suficiente para ser bombardeada.

O procedimento utilizado por TAYLOR *et al.* (1992) para obtenção e seleção de calos embriogênicos ocupa cerca de 10-12 semanas para garantir uma quantidade razoável de calos para bombardeamento.

Segundo BIRCH *et al.* (1995), o tratamento osmótico dos calos com manitol e sorbitol por no mínimo 4 horas antes e 4 horas depois do bombardeamento, como recomendado por VAIN *et al.* (1993), pode reduzir injúrias celulares.

2.3.2. Condições de bombardeamento

Os primeiros passos para o desenvolvimento de um equipamento de biolística para transformação genética foram dados por pesquisadores da Universidade de Cornell, que desenvolveram um acelerador de partículas de tungstênio capaz de introduzi-las em células. Neste equipamento, esses pesquisadores reconheceram um mecanismo universal para transportar substâncias como anticorpos, enzimas e material genético para dentro de células (SANFORD *et al.*, 1987). A demonstração de expressão transiente em tecido de cebola bombardeado (KLEIN *et al.*, 1988), fez com que a técnica fosse adotada e modificada sucessivamente por grupos de pesquisadores de diversas partes do mundo (BIRCH & FRANKS, 1991).

O modelo de aparelho desenvolvido pela Universidade de Cornell é comercializado pela Du Pont, mas, possivelmente devido a problemas de patente e restrições de uso, muitos grupos de pesquisa têm desenvolvido seus próprios equipamentos, com custos relativamente baixos (BIRCH & FRANKS, 1991).

O aparato biolístico descrito por FINER *et al.* (1992) utiliza gás Hélio e vácuo parcial, podendo ser facilmente reproduzido. Apresenta ainda um porta-filtro de seringa acoplado na saída do gás, que facilita o carregamento das micropartículas. É este o equipamento recomendado por BIRCH *et al.* (1995), para bombardeamento de calos embriogênicos de cana-de-açúcar.

A forma de precipitação do DNA na superfície das micropartículas de tungstênio, também é descrita por FINER *et al.* (1992) e recomendada por BIRCH *et al.* (1995).

A medida mais conveniente da eficiência de um aparato para introduzir DNA em células intactas é o número de células que expressam de forma transiente um dado gene repórter. O sistema repórter GUS (β -glucuronidase), de JEFFERSON *et al.* (1987), tem sido o mais utilizado para determinar o número de células expressando por disparo e, conseqüentemente, otimizar condições de bombardeamento. Trata-se de um sistema rápido, estável e de fácil detecção. A expressão GUS pode ser quantificada histoquimicamente, um a dois dias após o bombardeamento, após reação com ácido 5-bromo-4-cloro-3-indoil- β -D-glucurônico (X-gluc) e contagem dos focos azuis (JEFFERSON *et al.*, 1987), ou fluorimetricamente. O primeiro tipo de análise é o mais utilizado em cana-de-açúcar (FRANKS & BIRCH, 1991; CHOWDHURY & VASIL, 1992; GALLO-MEAGHER & IRVINE, 1993; GAMBLEY *et al.*, 1993) e fornece resultados em cerca de 48 horas. Como esta substância provoca a morte das células, este gene serve apenas para verificar níveis de expressão em um determinado sistema, ou seja otimizar parâmetros (BIRCH & FRANKS, 1991).

A transferência de genes pelo método biolístico, assim como os demais, necessita ser otimizada para cada condição e material vegetal. Em cana-de-açúcar, BIRCH *et al.* (1995) registraram um aumento de dez vezes na eficiência de transferência de genes em calos embriogênicos com a otimização das condições de bombardeamento, que segundo eles, corresponde a um aumento na frequência de transformação estável.

Segundo BIRCH & FRANKS (1991), pelo menos cinco fatores interagem para afetar a frequência de expressão transiente em células e tecidos bombardeados: o tamanho e composição dos microprojéteis, impregnação das partículas com DNA, impacto da velocidade do microprojétil, grau de danos

provocados pelo bombardeamento e finalmente, construção genética e tipo de tecido. Baseando-se nestes fatores é que os parâmetros de bombardeamento são otimizados, geralmente utilizando-se a contagem dos pontos azuis de expressão GUS.

RUSSEL *et al.* (1992) verificaram que há uma maior injúria das células quando estas são colocadas muito próximas da fonte de partículas. Os danos provocados por bombardeamento podem ser minimizados através da otimização da pressão de disparo e da distância do alvo, bem como da escolha dos microprojéteis.

A grande variação nos resultados entre bombardeamentos consecutivos, usando tratamentos aparentemente idênticos, parecem ser uma característica comum de aparatos de transferência de genes via microprojéteis (FRANKS & BIRCH, 1991, KLEIN *et al.*, 1988; SANFORD, 1988). Bombardeamento de calos embriogênicos de cana-de-açúcar, rotineiramente produzem 160-260 células positivas / cm² em ensaios de expressão GUS (BIRCH *et al.*, 1995).

2.3.3. Processo de seleção de transformantes

Embora muitas espécies monocotiledôneas já tenham sido transformadas com sucesso pelo método biolístico, existem poucos genes marcadores disponíveis para esse grupo de plantas (ZHOU *et al.*, 1995). O gene *neo* (neomicina fosfotransferase) confere resistência a antibióticos aminoglicosídeos como a kanamicina e a geneticina (G418) que são considerados fitotóxicos. O marcador seletivo pode ser utilizado em uma mesma construção plasmidial com o gene de interesse, ou em plasmídios separados que caracteriza a co-transformação.

A kanamicina tem se mostrado pouco eficaz como agente seletivo em gramíneas, quando se compara com a sua ação em espécies dicotiledôneas. Seu uso nessas espécies tem sido desencorajado devido ao alto nível de resistência endógena apresentado e pela interferência na regeneração de células transformadas (HAUPTMANN *et al.*, 1988; NEHRA *et al.*, 1994). Além disso, dependendo da espécie e do tipo de tecido utilizado como alvo, células internas que não estão em contato direto com a substância, podem resultar em regenerantes primários quiméricos. Se a pressão de seleção for removida precocemente durante a regeneração de plantas, regenerantes não transgênicos podem predominar, particularmente se concentrações menores de antibiótico forem utilizadas na tentativa de minimizar algum efeito deletério sobre a regeneração de calos transformados (BIRCH & FRANKS, 1991). Embora pouco utilizada em gramíneas, em dicotiledôneas seu uso é generalizado.

Para monocotiledôneas, a melhor opção é o antibiótico geneticina. Segundo NEHRA *et al.* (1994) ele não interfere no processo de regeneração e pode portanto, ser utilizado para seleção em estágios iniciais. Estes autores utilizaram 75 mg/L para seleção de trigo transgênico, onde também foi testado outro agente seletivo, a L-fosfinotricina, o ingrediente ativo do herbicida comercial Basta® (Hoechst AG). Neste caso foram constatadas interferência no processo de regeneração e alta porcentagem de escapes (50%). Para os autores, a geneticina é o melhor agente seletivo para trigo. Resultados similares foram reportados por BATTRAU & HALL (1992) e PENG *et al.* (1992) em arroz, e por BOWER & BIRCH (1992) em cana-de-açúcar. BARCELO *et al.* (1994) utilizaram um esquema seletivo para o cereal *Tritordeum* (*Hordeum* x *Triticum*) de 3 a 4 semanas em meio contendo 50 mg/L de geneticina. Após esse período os calos eram subcultivados até ocorrer regeneração

de brotos, que passavam a se desenvolver em meio sem o antibiótico. Os autores verificaram uma ligeira redução na capacidade de regeneração em meio seletivo quando comparado ao controle, mas foi confirmada a presença do gene *neo* em 70% das plantas selecionadas. RITALA *et al.* (1993), utilizando geneticina como agente seletivo para células em suspensão de cevada (100mg/L, por 6 semanas), mostraram freqüências de amostras *neo* positivas entre 93 e 100% do material resistente à geneticina, indicando alta eficiência de seleção.

Outra opção para monocotiledôneas seria a utilização de outro marcador seletivo, como a higromicina, alterando o gene escolhido para transformação, para higromicina fosfotransferase (*hph*). ZHANG *et al.* (1996) utilizaram esse marcador em arroz e selecionaram transformantes em meio contendo 50 mg/L de higromicina. Marcadores para resistência a herbicidas também têm sido opções, além de, em certos casos, ser de interesse agrônomo. ZHOU *et al.* (1995) reportaram dois genes para tolerância a glifosato - ingrediente ativo do herbicida comercial Roundup® (Monsanto Co.) - *cp4* e *gox*. O gene mais utilizado para monocotiledôneas tem sido o *bar*, que codifica a fosfinotricina acetil transferase e confere resistência ao glufosinato - ingrediente ativo do herbicida comercial Basta® (Hoechst AG). Entretanto, a maioria dos agentes seletivos para o gene *bar*, não elimina completamente os escapes (CHRISTOU *et al.*, 1991). BIRCH *et al.* (1995) encontraram grande variação entre experimentos com concentração de fosfinotricina necessária para inibir o desenvolvimento de calos não transformados de uma mesma variedade de cana-de-açúcar. A sensibilidade também variou com o tipo de calo e o estágio de desenvolvimento. Estes autores também pesquisaram os genes da luciferase e da antocianina como alternativas para o uso de seleção em antibióticos. A

antocianina retardou o desenvolvimento dos calos, causou anormalidades morfológicas e morte de plantas antes de atingir 1,5 cm. Para o sistema com luciferase, o excesso de material não transformado, a ser manuseado até o ensaio, torna a técnica impraticável para uso de rotina (BIRCH *et al.*, 1995).

2.3.4. Escolha do promotor

CHOWDHURY & VASIL (1992) alertam para a importância do promotor utilizado no plasmídio, que afeta de forma significativa a eficiência de transformação. O promotor consiste de uma pequena seqüência de bases que dirige a expressão de um gene a nível de proteínas. Os autores utilizaram o promotor 35S do CaMV (vírus do mosaico da couve-flor) para dirigir a expressão do gene *gus* e verificaram uma baixa expressão, quando comparada com trigo e milho. Um resultado similar também foi reportado por RATHUS & BIRCH (1992), que não detectaram expressão GUS após introdução de plasmídio contendo o 35S do CaMV como promotor em protoplastos de cana-de-açúcar. GALLO-MEAGHER & IRVINE (1993) estudaram os efeitos de quatro tipos de promotores sobre a atividade *gus* e chegaram a conclusões similares aos autores já mencionados. O promotor que regula a expressão do gene da ubiquitina 1 do milho (*Ubi-1*), mostrou-se superior ao Emu, ao actina 1 do arroz (*Act1*) e ao 35S do CaMV. O uso do promotor da ubiquitina do milho em transformação genética de monocotiledôneas tem aumentado a expressão dos genes de interesse, de forma que construções plasmidiais contendo este promotor já estão disponíveis (CHRISTENSEN & QUAIL, 1996).

Segundo BIRCH *et al.* (1995), vários esforços estão sendo concentrados na tentativa de se obter promotores específicos que induzam a expressão de genes em determinados órgãos vegetais, como por exemplo raízes. Várias técnicas estão sendo utilizadas para isolar promotores de outras espécies de plantas que pareçam promissores para cana-de-açúcar, mas o nível de ploidia do genoma desta espécie pode ser um problema adicional.

2.3.5. Escolha do transgene de interesse

Um dos focos da pesquisa em biologia molecular vegetal é o desenvolvimento de tecnologia para melhorar características como resistência a insetos e doenças e aumentar produção ou melhorar a qualidade de cultivares. Este objetivo é perseguido através do desenvolvimento de técnicas moleculares e ferramentas para identificar e caracterizar doenças e pragas, isolar genes específicos, caracterizá-los e transferi-los para a planta (MOORE, 1996).

Os métodos de transformação genética de cana-de-açúcar alcançaram um nível em que já é possível pensar em transformação como um método viável de melhoramento. A limitação para a aplicação prática deste método parece ser a disponibilidade de genes de importância agronômica.

A primeira transformação prática em cana-de-açúcar, que apresentou algum interesse agronômico, foi o aumento da tolerância a herbicida, conseguido com a introdução do gene *bar*, que codifica a fosfinotricina acetil transferase, aumentando a resistência a herbicidas do grupo do bialafos e glufosinato de amônio.

O controle de plantas invasoras na cultura da cana-de-açúcar é uma prática rotineira e sistemática, efetuada na maioria das vezes de forma preventiva com herbicidas pré-emergentes que freqüentemente não produzem o efeito esperado, transformando seu custo inicial em prejuízo direto, mais as possíveis perdas por matocompetição (RICCI JUNIOR, 1997). A possibilidade de utilização de herbicidas pós-emergentes, como os glufosinatos e bialafos certamente ofereceriam um controle mais efetivo das invasoras.

O gene da capa proteica do vírus do mosaico da cana-de-açúcar mostrou expressão transiente em protoplastos de cana-de-açúcar (SMITH *et al.*, 1992) e plantas transformadas já foram obtidas no Texas. Estudos têm sido realizados com o gene *bt* do *Bacillus thuringiensis*, para desenvolver resistência a certas pragas. Com o desenvolvimento de promotores específicos e o isolamento e caracterização de genes de resistência a pragas e doenças, é possível que dentro de pouco tempo já se consiga melhorar outras características agronômicas (MOORE, 1996).

Uma linha de pesquisa que tem se mostrado promissora é a obtenção de resistência a insetos através da introdução na planta de genes inibidores de proteinases. Para isso, busca-se genes capazes de reduzir a taxa de crescimento de uma população de insetos, sem contudo eliminá-la, evitando uma forte pressão de seleção que fatalmente favoreceria o surgimento de novos biotipos (WOLFSON & MURDOCK, 1995).

Vários genes para resistência a insetos, doenças e herbicidas já foram isolados e mostraram-se eficientes em ensaios de campo em plantas transgênicas de outras espécies. Alguns desses genes já poderiam ser adaptados para testes com cana-de-açúcar, mas geralmente há necessidade de acordos ou negociações

comerciais com as organizações que fizeram investimentos em pesquisas para isolar estes genes. Projetos visando isolamento e testes de genes para resistência a doenças provocadas por vírus e bactérias em cana-de-açúcar já estão bem avançados e genes que influenciam o acúmulo de açúcar também já estão sendo estudados (BIRCH, 1996).

2.3.6. Co-transformação

Com exceção da resistência a herbicida, geralmente não é possível selecionar diretamente para transformantes com genes de interesse agronômico. Uma possibilidade é ter em uma mesma construção plasmidial o gene de interesse e o gene marcador. Outra opção é misturar em uma mesma suspensão de partículas, dois vetores, um contendo o gene de interesse e outro contendo o gene marcador, um gene de resistência a antibiótico, por exemplo. Neste último processo, uma proporção de plantas transformadas, selecionadas pela resistência ao antibiótico, terá incorporado também o gene de interesse agronômico, em um fenômeno conhecido como co-transformação (BIRCH, 1996). Estes autores relataram taxas de mais de 60% de co-expressão de genes co-precipitados em transformação de cana-de-açúcar.

Devido a uma carência de conhecimentos fisiológicos e restrições tecnológicas, a biotecnologia vegetal ainda hoje baseia-se no conceito “um gene - uma característica”. Entretanto, muitas características são determinadas por múltiplos genes. A principal barreira é a dificuldade de se construir vetores de transformação estáveis que contenham múltiplos genes (dos quais o marcador seletivo é sempre um deles). Uma das formas para se superar esta dificuldade técnica é a co-

transformação, onde em um único evento de transformação duas ou mais moléculas de DNA separadas são co-integradas no genoma. Estas moléculas de DNA podem ser integradas em um mesmo locus, em diferentes loci em um mesmo cromossomo, ou em diferentes loci em diferentes cromossomos. Se múltiplos genes são co-inseridos por meio de transformação direta, em geral todos se integram no mesmo locus. Se múltiplos genes devem ser integrados a ligação é desejável. Entretanto, integrações não ligadas também podem ter aplicações práticas. Se um marcador seletivo não é desejado na planta transgênica é melhor que ele se integre em um sítio distante do gene de interesse para permitir sua eliminação em cruzamentos (DE BLOCK, 1993).

Em resumo, é possível introduzir múltiplos genes em um ciclo de transformação no genoma vegetal. Em geral a transformação direta resulta em integrações ligadas, enquanto no sistema com *Agrobacterium* ocorrem ambas, ligadas e não ligadas (DE BLOCK, 1993)

2.4. Silenciamento de transgenes

Uma inesperada descoberta dos primeiros estudos de plantas transgênicas de cana-de-açúcar foi que a expressão de alguns genes era bloqueada após algum tempo em muitas linhas, em um processo conhecido como silenciamento de transgene (BIRCH, 1996).

A expressão do gene é controlada por seqüências (regiões promotoras) geralmente localizadas imediatamente antes do gene, que determinam a força, o momento apropriado e a especificidade do tecido para que o gene adjacente se

expresse. Algumas vezes, esse controle é influenciado por seqüências mais distantes (estimuladores ou silenciadores) ou por fatores mais amplos, como a condensação do sítio do cromossomo onde o transgene foi inserido. Este controle, também pode operar depois, no processo de expressão do gene, por exemplo, sobre a estabilidade do produto proteico do gene.

Enquanto as companhias privadas que utilizam a transformação genética como ferramenta para obter novos genótipos estão empenhadas em encontrar formas de evitar o silenciamento de genes, um pequeno grupo de cientistas básicos está fascinado com o fenômeno e analisa uma variedade de sistemas envolvidos. Para este grupo, o silenciamento representa mais do que uma simples resposta indesejável à introdução de genes exógenos. Ele fornece ferramentas para compreender os caminhos pelos quais as plantas naturalmente se utilizam de seqüências homólogas ou complementares de ácidos nucleicos para modificar a expressão de genes (MATZKE & MATZKE, 1995).

Os promotores utilizados nos recentes estudos de transformação de cana-de-açúcar mostraram forte expressão em células bombardeadas. Em outras palavras, são promotores fortemente constitutivos. O silenciamento de genes introduzidos tem sido observado em uma certa proporção em transformantes de outras espécies mas, em cana-de-açúcar, o silenciamento ocorreu na regeneração de plantas, em todas as linhas, quando certos promotores foram utilizados. Como resultado, não houve correspondência entre a expressão transiente (medida logo após o bombardeamento), e o nível de expressão em plantas transgênicas (expressão estável). Isto é de grande interesse prático porque a expressão previsível e estável de genes introduzidos é um pré-requisito para o uso de engenharia genética no

melhoramento genético da cana-de-açúcar. Uma explicação para o silenciamento é que os promotores podem perder algum trecho necessário à expressão do transgene. Para alguns caracteres, há necessidade de promotores mais específicos para certos órgãos ou tecidos do que promotores fortemente constitutivos. Infelizmente, para cana-de-açúcar, várias regiões “promotoras” extraídas e testadas têm sido inativadas ou silenciadas quando acopladas a um gene repórter e reintroduzida em cana-de-açúcar (BIRCH, 1996).

2.4.1. A influência do estágio celular no processo de transformação

Os tipos de células com potencial morfogênico, não correspondem necessariamente a células transformáveis. Também não está claro se a duplicação e ou transcrição do DNA ocorre quando as células são transformadas. Os resultados obtidos em transformação direta utilizando cultura de células sincronizadas indicaram que a divisão celular aumenta a frequência de duplicação do DNA, principalmente se o explante consiste de células diferenciadas que estão na fase G1 do ciclo celular. Isso pode resultar em maior poder de inserção do transgene, explicando a maior frequência de transformação observada neste caso. Entretanto, se a transformação ocorre durante a fase de de-diferenciação celular, existe o perigo do DNA se integrar em regiões do cromossomo que estão “desligadas” em tipos específicos de células ou até mesmo em toda a planta. Os transformantes da fase S (síntese) e M (mitótica) tendem a ter maior número de cópias integradas. Na fase S, são observados padrões complexos de integração e rearranjos, enquanto que na fase M os rearranjos são menos frequentes (DE BLOCK, 1993).

2.4.2. O “efeito de posição”

Várias publicações têm mostrado coerência na instabilidade quanti e qualitativa dos transgenes. Essa variação na expressão de um transgene é chamada de “efeito de posição” e é provavelmente devida à inserção ao acaso do DNA introduzido no genoma. Dependendo do ambiente do genoma no sítio de inserção, a expressão do transgene pode ser acentuada, suprimida ou desregulada (DE BLOCK, 1993).

Dados de pesquisas com animais indicaram que o DNA cromossomal de eucariotos superiores é organizado em domínios que definem unidades de compactação da cromatina. Esses domínios parecem ser delimitados por estruturas de nucleoproteínas especiais, os “elementos de fronteira” (boundary elements). A própria condensação do cromossomo dentro de um núcleo obriga interações entre os elementos regulatórios de um domínio e promotores de outro. Esses elementos de fronteira também devem definir limites de condensação de cromatina dentro da eucromatina. Essas fronteiras devem delimitar regiões que estão em estado ativo ou inativo. Em outras palavras, um domínio deve corresponder a uma unidade de regulação do gene. Isso pode explicar certos graus de variação na expressão de um transgene entre transformantes independentes. Dependendo do tipo de domínio em que o transgene é inserido, sua expressão pode ser reduzida por silenciadores, ou intensificada por ativadores. Vários experimentos já demonstraram que esses elementos de fronteira, quando flanqueando um gene, são capazes de protegê-lo, até certo ponto, contra efeitos de posição (DE BLOCK, 1993).

Embora a variação na expressão de um transgene pelo efeito de posição possa ser resolvida em um futuro próximo pelo uso de elementos de fronteira, uma outra alternativa para a padronização da expressão gênica é direcionar a inserção do transgene. Ao invés de flanquear os genes com elementos de fronteira, no direcionamento, os genes são inseridos em um certo domínio do genoma da planta que é o mesmo em todos os transformantes. Essa inserção sítio-dirigida é obtida por meio de recombinações homólogas (no lugar de recombinações ilegítimas que é o mecanismo normal em transformação) entre um locus cromossômico (natural ou artificial) e a molécula de DNA que penetrou. Entretanto, esse processo é ainda muito ineficiente em vegetais, quando comparado com animais. Mas, com os conhecimentos sobre a influência dos domínios na expressão do gene será possível inserir um gene específico em domínios cromossômicos nos quais, uma mínima interferência na expressão seja esperada. Embora a inserção sítio-dirigida possa resultar em uma expressão mais reproduzível de um transgene em particular, o melhorista poderia questionar se esta forte padronização é realmente desejada ou se um certo grau de variação na expressão permitiria escolher a linha que melhor se ajusta ao seu programa de melhoramento (DE BLOCK, 1993).

2.4.3. Co-supressão e epistasia

Co-supressão e interações epistáticas entre transgenes em células vegetais foram reportadas pela primeira vez por MATZKE *et al.* (1989). Desde então, várias publicações têm descrito fenômenos similares. Co-supressão é a inativação coordenada de dois (trans)genes em uma planta, enquanto, na epistasia um

(trans)gene, o supressor, inativa outro (trans)gene. Interações epistáticas são irreversíveis em células somáticas, enquanto co-supressão apresenta reversibilidade somática. Em ambos os casos, o transgene suprimido pode ser reativado se a planta que o contém for cruzada com a planta que contém o gene supressor. A inativação do transgene pode ocorrer por algum tempo durante o ciclo de vida da planta, mas a idade ou algum tipo de stress podem acentuar o silenciamento gênico. O fenômeno da inativação de genes é normal durante o desenvolvimento da planta e isso não se restringe a transgenes. Entretanto, detecta-se mais facilmente em transgenes por estes serem alvos de pesquisa (DE BLOCK, 1993). Os transgenes podem ainda, causar o silenciamento de genes vegetais endógenos, se eles forem suficientemente homólogos (STAM *et al.*, 1997). Em resumo, a expressão de um transgene ou de um gene endógeno qualquer, pode ser influenciada pela presença de um transgene homólogo ou de um gene endógeno.

O silenciamento é um fenômeno que ocorre durante ou após a transcrição, sendo que em genes endógenos ocorre predominantemente silenciamento pós-transcricional.

Se transgenes virais são introduzidos e silenciados, o processo pós-transcricional também impede que RNAs virais homólogos se acumulem; este é um dos mecanismos de geração de plantas resistentes a vírus. Um dos grandes avanços recentes da pesquisa é dissecar o(s) mecanismo(s) dessas seqüências homólogas dependentes do fenômeno de silenciamento de genes. Vários fatores parecem participar do processo, incluindo metilação do DNA, número de cópias do transgene, nível de expressão, possível produção de RNAs aberrantes e interações ectópicas DNA-DNA. A relação entre esses fatores e a ligação entre silenciamento transcricional

e pós-transcricional nem sempre é clara. Análises de plantas transformadas têm expandido os conhecimentos de processos fisiológicos e mecanismos de regulação gênica. Entretanto os transgenes não agem de forma previsível, revelando a existência de processos desconhecidos. Existe variação considerável na expressão de transgenes em transformantes individuais, que não é devida a diferenças no número de cópias inseridas. Então, a atividade do gene não é determinada exclusivamente pela força do promotor que controla a transcrição, efeitos epigenéticos também influenciam nos níveis de expressão. Isso algumas vezes conduz para inativação, seja por bloqueamento da transcrição ou por inibição no acúmulo de mRNA (STAM *et al.*, 1997).

Até agora, o silenciamento gênico tem sido um campo confuso da pesquisa. A maioria dos casos é descoberta ao acaso, ao analisar plantas transgênicas, mas os mecanismos pelos quais ele ocorre ainda não são bem compreendidos.

Várias possibilidades têm sido utilizadas para explicar variações nos níveis de expressão de transgenes em plantas transformadas, que é independente do número de cópias inseridas. Tudo isso indica que transgenes integrados podem não ser considerados como unidades independentes de transcrição. Se eles são inseridos em eucromatina, em uma região transcricionalmente ativa, a expressão deve ser influenciada por seqüências regulatórias dos genes próximos. Se a inserção ocorrer em regiões de DNA repetitivo ou em heterocromatina eles podem ser inativados. Outro fator importante associado ao silenciamento é o número de transgenes por sítio de integração. O sistema de transferência de T-DNA pode inserir dois ou mais T-DNAs em um mesmo sítio do cromossomo. Esses podem ser arranjos “cabeça-

rabo" (head-to-tail), em uma repetição direta, e "cabeça-cabeça" (head-to-head) ou "rabo-rabo" (tail-to-tail), em repetição invertida. As configurações invertidas freqüentemente apresentam baixa expressão (STAM *et al.*, 1997).

Geralmente o silenciamento transcricional resulta da inativação do promotor e o pós-transcricional resulta do não acúmulo de mRNAs. Em ambos os casos a metilação parece fortemente envolvida, principalmente na inativação de promotores.

O silenciamento de genes geralmente é detectado quando o sistema já alcançou uma condição de equilíbrio. Isso significa que nada é conhecido sobre os eventos logo após a inserção. Portanto, permanece sem esclarecimento como a metilação estabelece o silenciamento, ou como é a resposta a mudanças na estrutura da cromatina. Alguns fatores devem estar envolvidos na metilação "de novo" das seqüências do transgene: o ambiente cromossômico do transgene, a repetição e as interações DNA-DNA (STAM *et al.*, 1997).

Quando um transgene se insere em uma região fortemente metilada e/ou repetitiva ele é silenciado. Entretanto, um transgene integrado em uma região hipo-metilada também pode ser inativado transcionalmente. Acredita-se que essa metilação "de novo" do gene exógeno seja uma resposta de defesa contra a atividade potencialmente prejudicial deste gene. Não se sabe como o DNA é reconhecido como sendo "estranho", mas deve ser relacionado ao conteúdo relativo de adenina-timina (AT) que flanqueia o DNA (STAM *et al.*, 1997).

Os casos de silenciamento induzido por repetição do transgene lembram o fenômeno em outros eucariotos e as mutações de ponto induzidas por repetição em *Neurospora crassa*. Em geral, as cópias a mais contidas em um locus

leva à inativação. Nos casos de inserções repetitivas inversas (“cabeça-cabeça” ou “rabo-rabo”), a facilidade de se criar uma forma de cruz certamente favorece a ação da DNA-metiltransferase (STAM *et al.*, 1997).

Resumindo, parece razoável concluir que muitos casos de silenciamento de genes envolvem processos que atuam sobre DNA e/ou RNA, como a estrutura da cromatina do transgene e dos genes endógenos e a metilação do DNA. Uma forma de interpretar as várias observações associadas ao silenciamento é que existem vários caminhos independentes levando ao mesmo fenômeno (STAM *et al.*, 1997).

2.5. Análises moleculares

O campo da engenharia genética de plantas evoluiu muito rapidamente na última década, mas a despeito da extensão dessas mudanças, a necessidade de se determinar se um material foi ou não transformado permanece (REGISTER III, 1997).

Entende-se por célula transformada aquela que teve a introdução de uma seqüência de DNA. Portanto, o termo transformada não deve ser confundido com transgênica, que se refere à célula em que o DNA de interesse foi integrado no genoma. Por unidade de transcrição, entende-se todos os componentes do vetor que contribuem para a expressão do transgene, isto é, promotor, seqüências codificadoras, sítios de poliadenilação e outras seqüências regulatórias empregadas. Como não é raro várias cópias de um transgene inserirem em um mesmo sítio (independente do método de transformação), número de cópias e número de sítios de

inserção de um transgene, não são os mesmos termos e não devem ser utilizados como sinônimos (REGISTER III, 1997).

Análises bioquímicas e moleculares de materiais transformados são feitas, primeiro para determinar se o material é transgênico, e segundo, para caracterizar o material quanto ao número de cópias inseridas e/ou a complexidade da inserção do DNA e avaliar a expressão do transgene. Uma grande variedade de ferramentas estão disponíveis para estes tipos de análises, mas a análise Southern é, com certeza, uma das mais poderosas, possibilitando triagem para presença ou ausência de seqüências específicas, determinação da complexidade da integração, estimativa do número de cópias do transgene inseridas, etc (REGISTER III, 1997).

2.5.1. Presença e estrutura do transgene

A tecnologia PCR é talvez o método mais popular para selecionar materiais para presença ou ausência de seqüências transgênicas. Ela é particularmente utilizada para análises rápidas de um grande número de amostras, mas, a despeito de sua popularidade, o PCR possui várias características que limitam as conclusões possíveis. Um resultado positivo mostra apenas que existem seqüências homólogas aos primers em uma amostra, em proximidade suficiente para um produto ser sintetizado. Os resultados não indicam se é a fonte de DNA desejado ou devido à contaminação, nem se a amostra de DNA está integrada ao genoma da planta (REGISTER III, 1997).

2.5.2. Hibridização Southern

Análise Southern é uma das mais poderosas ferramentas disponíveis para caracterização molecular de plantas transgênicas. Dependendo de como são conduzidas as digestões de restrição, pode-se obter informações sobre a complexidade da inserção, número de cópias presente, status integrativo e número de sítios cromossômicos onde os transgenes foram inseridos.

Para análises do número de cópias e complexidade da integração, as digestões devem ser conduzidas de forma a excisar o fragmento de DNA inteiro contendo a informação desejada, desde que ele contenha a seqüência codificadora e as seqüências regulatórias que o acompanham. O DNA do vetor utilizado para transformação deve ser digerido e analisado ao lado do DNA genômico para fornecer o controle necessário para avaliar rearranjos ou número de cópias. Bandas amostradas de tamanhos diferentes da banda controle são consideradas rearranjos; entretanto, este tipo de análise não caracteriza o rearranjo (REGISTER III, 1997).

Análises Southern podem ser utilizadas para fornecer evidências da integração de transgenes, incluindo a inserção em múltiplos sítios, mas não descartam a possibilidade de resultados enganosos. A análise é mais precisa quando o material analisado foi produzido por *Agrobacterium*. Neste caso, o T-DNA da borda direita produz uma junção tipicamente definida entre o vetor e a planta. Nesta análise de borda, a presença de múltipla bandas fornece evidência de múltiplos sítios de inserção, mas também pode resultar de rearranjos de transgene e multimerização de um simples sítio. A situação é menos confiável para material obtido por transformação direta, onde as junções do DNA genômico com o vetor são mais ao acaso. Duas

técnicas podem ser utilizadas. Em uma, a enzima de restrição corta apenas dentro do DNA da planta-mãe e não no vetor utilizado para transformação. A presença de múltiplas bandas de DNA é diagnóstico para integração em múltiplos sítios. Mas, os fragmentos resultantes contendo o transgene podem ficar muito grandes (principalmente se o DNA usado para transformação for maior que 5 kb) e múltiplos fragmentos podem não ter resolução, usando condições padrões de eletroforese. Uma alternativa é usar uma enzima de restrição que clive apenas uma vez dentro do transgene. Esta técnica tende a produzir fragmentos menores contendo o transgene, mas múltiplas bandas também podem ocorrer devido a rearranjos do transgene e multimerização dos sítios de inserção. Nessas técnicas, uma amostra de DNA com fragmento de tamanho diferente daquele produzido pelo vetor (principalmente uma banda de maior peso molecular) é indicativo, mas não prova de integração (REGISTER III, 1997).

2.5.3. Expressão do transgene

Análise de expressão do transgene estuda basicamente se proteínas ou RNAs se acumularam. Em muitos casos, foca sobre proteínas ou outros produtos finais, desde que o fenótipo desejado resulte do acúmulo de uma proteína específica. Quando análise de proteína não é possível, freqüentemente se utiliza análise do RNA transcrito. Também nos casos onde a análise da proteína não resulta no esperado, a análise de RNA pode fornecer informações sobre acúmulo e estabilidade do transcrito, que podem ajudar a explicar o fenótipo inesperado. Técnicas como a

transcrição reversa (RT-PCR), Northern e ensaio de proteção de ribonuclease (RPA) podem ser usadas para medir o nível de RNA (REGISTER III, 1997).

A RT-PCR pode ser utilizada como uma maneira rápida e relativamente poderosa de selecionar para presença ou ausência de um transcrito específico. As vantagens da RT-PCR, quando comparada a análises Northern ou RPA, são a pequena quantidade de material necessária, a alta sensibilidade e a facilidade no preparo das amostras. Diferente do Northern, entretanto, os resultados de RT-PCR não fornecem informações sobre o tamanho do transcrito (REGISTER III, 1997).

Imunoensaios são os métodos mais comumente utilizados para se estudar o acúmulo de proteínas em plantas transgênicas. Existem dois tipos de imunoensaios empregados: hibridização imunoblot (Western) e ELISA. As vantagens oferecidas pelos Westerns sobre os ELISAs incluem o menor desenvolvimento do ensaio e a facilidade de se acessar a massa proteica. Além disso, resultados aceitáveis podem ser obtidos utilizando preparados de anticorpos relativamente impuros. Entretanto, os Westerns consomem muito mais tempo que os ELISAs e os resultados quantitativos são aproximados (REGISTER III, 1997).

O principal entre os problemas técnicos encontrados quando se utiliza imunoensaios é um background inaceitável. Certos backgrounds devem ser devidos à interação específica de um anticorpo (primário ou secundário, se mais de um anticorpo é utilizado) com uma proteína no extrato, enquanto outros não são específicos. As duas fontes mais comuns de backgrounds são diluições de anticorpos e bloqueamento, que podem ser reduzidos com diminuição na concentração do anticorpo (REGISTER III, 1997).

Plantas transformadas de cana-de-açúcar, expressando genes reporteres, genes marcadores e genes de resistência têm sido confirmadas em análise bioquímicas e análises Southern. Sob condições de casa de vegetação, cerca de 5% das plantas transformadas mostraram variações no hábito de crescimento em regenerantes primários; mas em muitos casos estas variações eram devidas a efeitos epigenéticos, que não persistiam nas progênies vegetativas. Análises RAPD revelaram drásticas alterações em linhagens de calos derivadas de protoplastos, mas não detectaram variações em linhagens de plantas transformadas obtidas por bombardeamento com micropartículas (BIRCH *et al.*, 1995).

O estresse induzido pela cultura de tecidos e pelo processo de transformação pode provocar variações somaclonais genéticas ou epigenéticas. Cada estresse pode resultar na formação de compostos mutagênicos e somados, gerar efeitos drásticos. As plantas transformadas freqüentemente possuem muitas mutações que podem refletir no fenótipo. Isso indica que talvez não seja a melhor estratégia introduzir um gene em uma variedade final de um programa de melhoramento e sim no início do programa (DE BLOCK, 1993).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Radiogenética do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) e no Laboratório da Seção de Biologia Molecular do Centro de Tecnologia Copersucar, Piracicaba - SP.

3.1. Material Vegetal

Foram utilizados dois clones promissores de cana-de-açúcar produzidos pela Copersucar: O clone SP80-180, que apresenta um ótimo comportamento "in vitro", produzindo calos embriogênicos em grande quantidade, mas que não foi lançado como variedade por apresentar pouca resistência à ferrugem, e o clone SP82-3721, que também possui boas características agronômicas, mas, ao contrário do anterior, não possui um bom desempenho na produção de calos embriogênicos, criando assim, um contraste entre os dois materiais.

3.2. Obtenção de calos

Palmitos (região que contém o meristema, protegido por folhas jovens enroladas) provenientes de plantas com 6 a 12 meses, após retirada das folhas externas, ficando com cerca de 15 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro, foram superficialmente desinfetados em solução de hipoclorito de cálcio (20% do produto Hth). Após a retirada de mais uma ou duas folhas, já em condições assépticas, as folhas restantes que compunham o palmito foram seccionadas transversalmente em fatias de cerca de 3 mm, sendo cultivadas em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), com 5% de água de coco, 3 mg/L de 2,4-D e 50 mg/L de arginina e solidificado com 8 g/L de agar, pH 5,7 (TAYLOR *et al.*, 1992). Após 25 dias mantidos no escuro, à temperatura de 27°C, os explantes foram repicados e transferidos para meio fresco. Nesta fase, já se inicia a formação de calos, geralmente com dois tipos predominantes, um mais friável e translúcido, de comportamento não morfogênico na maioria das vezes, e um com aspecto nodular, opaco e não friável, facilmente destacável da estrutura original, geralmente embriogênico. Nas transferências de meio de cultura, procurou-se selecionar os calos embriogênicos.

3.3. Escolha da fase de subcultivo para bombardeamento

Para determinação da melhor fase da cultura a ser bombardeada, realizou-se um ensaio para quantificar os calos embriogênicos (explante utilizado no processo biolístico), obtidos em cada subcultivo, que regeneravam plantas. Para isso, 125 porções de calos embriogênicos (de aspecto nodular, opaco e não friável)

selecionadas a cada 25 dias, foram colocadas para regenerar plantas (meio de cultura semelhante ao inicial, mas sem o 2,4-D), enquanto outras 125 porções eram transferidas para meio de cultura de manutenção. Em cada fase, contou-se o número de plantas obtidas. Foram analisadas as fases R1, R2, R3, R4 e R5 (primeira, segunda, terceira, quarta e quinta fase de subcultivo com seleção de calos embriogênicos).

3.4. Otimização de Parâmetros

O acelerador de partículas utilizado para o bombardeamento foi desenvolvido no Centro de Tecnologia Copersucar, segundo instruções de FINER *et al.* (1992), combinando gás Hélio comprimido e vácuo parcial (ver equipamento na Figura 1).

Calos embriogênicos foram selecionados após 30 dias e mantidos por mais 25 dias nas mesmas condições (Fase R2). Quatro horas antes do bombardeamento, os calos foram transferidos para o mesmo meio de cultura, suplementado com manitol 0,4 M e sorbitol 0,4 M (modificado de VAIN *et al.*, 1993), dispostos em um círculo central de 3 cm de diâmetro, na placa de Petri.

Plasmídio:

Utilizou-se o plasmídio pAHC27 (gentilmente cedido pelo Dr. Peter H. Quail do USDA/ARS Plant Gene Expression Center, Albany, California, EUA), que contém o promotor da ubiquitina 1 do milho (Ubi-1) e o gene repórter da β -glucuronidase: *uid-A* (GUS) (CHRISTENSEN & QUAIL, 1996). A Figura 2 mostra um esquema representativo do plasmídio em questão.

Figura 1. Acelerador de micropartículas utilizado para introdução de genes em calos de cana-de-açúcar, desenvolvido no Centro de Tecnologia Copersucar, segundo instruções de Finer *et al.* (1992), combinando gás Hélio comprimido e vácuo parcial.

Figura 2. Esquema representativo do plasmídio pAHC27 (gentilmente cedido pelo Dr. Peter H. Quail do USDA/ARS Plant Gene Expression Center, Albany, California, EUA), que contém o promotor da ubiquitina 1 (bloco em negrito), e o gene repórter da β -glucuronidase: *uid-A* (GUS). Sítios de restrição: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; K, *Kpn*I; P, *Pst*I; Sa, *Sall*; Sc, *Sac*I; Sm, *Sma*I; Sp, *Sph*I; X, *Xba*I.

O DNA plasmidial foi precipitado em partículas de tungstênio M10 (GTE Sylvania Chemicals / Metals) a uma concentração de 4 μ g de DNA por mg de tungstênio. Para isso, 25 μ l de suspensão de partículas de tungstênio (100 mg/ml de glicerol 50%) foram misturados com 10 μ l de solução de DNA (1 μ g/ μ l), 25 μ l de cloreto de cálcio (2,5M) e 10 μ l de espermidina base livre (0,1M). Dos 70 μ l, 50 μ l foram descartados após decantação. O restante foi ressuspensionado e utilizado nos disparos (modificado de FINER *et al.*, 1992).

Condições de bombardeamento:

Para os disparos, 2,0 μ l da suspensão de partículas com o DNA foram colocados no centro de um porta-filtro de seringa Millipore, pré-autoclavado, acoplado ao acelerador de partículas, na saída do gás He. A placa de Petri contendo o tecido alvo, foi colocada em prateleira com distância ajustável. Uma malha metálica (1000 μ m de mesh) foi utilizada como tampa sobre a placa, para conter o movimento dos calos no momento do disparo.

3.4.1. Distância do alvo

Foram testadas cinco distâncias do alvo (5, 8, 11, 14 e 17 cm), através do ajustamento da prateleira do aparelho. Os demais parâmetros foram fixados em 9 Kgf/cm² e 1,0 μ g de DNA plasmidial por disparo. Foram realizadas 6 repetições para cada tratamento.

Análise da expressão transiente:

A expressão transiente do gene *gus* foi analisada histoquimicamente após a seguinte reação (modificado de JEFFERSON *et al.*, 1987):

- fixação dos calos bombardeados em etanol 70% por 1 minuto;
- lavagem em tampão fosfato de sódio (pH 7,0) por 3 vezes;
- incubação por uma noite, à 37°C em 3 ml de tampão fosfato de sódio contendo 1,5 mg de ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurônico (X-gluc);
- lavagem em etanol 70% por 3 vezes.

Os calos foram mantidos em etanol 70%, para exame em microscópio biocular (aumento de 20 x). Os pontos azuis de cada placa (disparo) foram contados para comparar os diferentes tratamentos. Cada ponto azul, independente do tamanho ou intensidade, foi contado como um ponto de expressão do gene *uid-A* (Figura 3).

3.4.2. Pressão de disparo

Para este experimento, a mesma metodologia descrita no item anterior foi utilizada, sendo testadas cinco pressões de disparo: 7, 8, 9, 10 e 11 Kgf/cm². Os demais parâmetros mantiveram-se fixos em 14 cm de distância do alvo e 1,0 µg de DNA por disparo. Foram realizadas 6 repetições para cada tratamento.

3.4.3. Quantidade de DNA

Com a mesma metodologia descrita no item 3.4.1., foram testadas cinco quantidades de DNA precipitadas na superfície das partículas de tungstênio: 0,1; 0,5; 1,0; 2,5 e 5,0 µg por disparo. Os demais parâmetros foram mantidos em 14 cm de distância do alvo e 8 Kgf/cm² de pressão de disparo.

Figura 3. Calo embriogênico de cana-de-açúcar, clone SP80-180, expressando o gene da β -glucuronidase (*uid-A*). Cada ponto azul, independente do tamanho ou intensidade, foi considerado um ponto de expressão GUS, nos experimentos de otimização de parâmetros.

3.5. Determinação da estabilidade da expressão GUS

Analisou-se a estabilidade da expressão GUS em um experimento onde, após bombardeamento dos calos, fez-se amostragens ao longo do tempo (1, 2, 4, 8, 12, 15, 20, 24, 29 e 35 dias) e verificou-se a expressão, histoquimicamente, em número de pontos azuis por grama de calos.

Análise Estatística: Os dados dos quatro experimentos descritos acima foram submetidos a análise de variância (PROC ANOVA) e as médias dos tratamentos foram separadas utilizando o teste de Tukey (menor diferença significativa) (STATISTICS ANALYSIS SYSTEM, 1985).

3.6. Análise microscópica do material bombardeado

3.6.1. Microscopia ótica

Calos bombardeados foram fixados em tampão cacodilato de sódio 0,2M contendo 3% de paraformaldeído e 2% de glutaraldeído, pH 7,2, por uma noite, sob refrigeração. A seguir foram desidratados em série etílica de 50, 60, 70, 80, 90 e 100% de etanol, sendo 20 minutos em cada concentração. Adicionou-se então, meio de infiltração (kit Historesin, Jung) com etanol 100% (1:1), por 12 horas, substituindo por meio de infiltração 100%, até que as amostras se depositassem no fundo do recipiente. Após polimerização em moldes plásticos, por 48 horas, os cortes (5 μ m) foram realizados em micrótomo Leica RM 2155, utilizando-se lâmina descartável,

devido à presença das partículas de tungstênio. Para coloração, utilizou-se imersão das lâminas em solução de fucsina ácida 1%, por 5 minutos, seguido de lavagem em água por alguns segundos e, em seguida imersão das lâminas em solução de azul de toluidina 0,05%, com secagem ao ar. As lâminas foram fotografadas sem a colocação de lamínulas, para melhorar a distinção das partículas de tungstênio.

3.6.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

Calos bombardeados foram fixados com 2% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1M, por uma noite. Após 3 lavagens em cacodilato de sódio 0,2M (20 minutos cada), procedeu-se a desidratação das amostras em série etílica: 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95, e 100%, sendo a última por 3 vezes. Após secagem ao ponto crítico com dióxido de carbono, as amostras foram cobertas com ouro e observadas ao microscópio eletrônico de varredura DMS-940A do Núcleo de Apoio à Pesquisa - Microscopia Eletrônica na Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA, ESALQ,USP).

3.7. Escolha da dose seletiva de geneticina

Geneticina filtro-esterilizada foi adicionada ao mesmo meio de cultura utilizado na obtenção de calos, nas concentrações de 0, 15, 30, 45, 60 e 100 mg/L. Os calos embriogênicos do clone SP80-180 foram transferidos para os 6 diferentes tratamentos em 8 repetições, sendo uma repetição igual a uma placa de Petri com 10 porções de calo. O processo de cultivo não foi alterado e em 15 dias foi realizada a primeira avaliação, com contagem das porções de calo com aspecto normal. Após esta

avaliação, metade dos calos de cada tratamento foi submetida a concentrações mais elevadas, passando de 0 para 15 mg/L de geneticina, de 15 para 30 mg/L e assim sucessivamente.

Após 15 dias, nova avaliação e nova transferência, agora para meio de regeneração (em ausência da auxina 2,4-D), com manutenção das concentrações de geneticina. Depois de 40 dias, quantificou-se a porcentagem de plantas regeneradas em relação ao controle (sem geneticina).

3.8. Co-transformação

Após otimização dos parâmetros (14 cm de distância do alvo, 8 Kgf/cm² de pressão de disparo e 1,0 µg de DNA por disparo) e escolha da dose de geneticina a ser utilizada no processo seletivo (30 mg/L), partiu-se para a realização de uma série de 25 experimentos repetitivos (10 com o clone SP82-3721 e 15 com o clone SP80-180) objetivando-se a obtenção de plantas transformadas com o gene *neo*, que confere resistência a antibióticos aminoglicosídicos como a geneticina e a kanamicina, e com o gene *bar*, que confere resistência a herbicidas do tipo glufosinato de amônio (produto comercial Finale).

Para este propósito, foram utilizados os plasmídios pHA9, gentilmente cedido pelo Dr. Henrik Albert, do Hawaiian Agricultural Research Center, Honolulu, Hawaii, EUA, e pAHC20, gentilmente cedido pelo Dr. Peter H. Quail do USDA/ARS Plant Gene Expression Center, Albany, Califomia, EUA. O plasmídio pHA9 contém o gene *neo* que codifica para neomicina fosfotransferase e o plasmídio pAHC20 contém o gene *bar* que codifica a fosfinotricina acetil transferase, ambos com o promotor *ubi-1* (ubiquitina 1 do milho) (Ver nas Figuras 4 e 5 os esquemas representativos dos plasmídios em questão).

Figura 4. Esquema representativo do plasmídio pHA9 (gentilmente cedido pelo Dr. Henrik Albert, do Hawaiian Agricultural Research Center, Honolulu, Hawaii, EUA), que contém o promotor da ubiquitina do milho (*ubi-1*), representado pelo bloco em negrito, e o gene *neo* que codifica para neomicina fosfotransferase (NPT-II). Sítios de restrição: B, *Bam*HI; Bg, *Bgl*II; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; N, *Nae*I; P, *Pst*I; Sa, *Sal*I; Sp, *Sph*I; T, *Tth*I; X, *Xba*I.

Figura 5. Esquema representativo do plasmídio pAHC20 (gentilmente cedido pelo Dr. Peter H. Quail do USDA/ARS Plant Gene Expression Center, Albany, California, EUA), que contém o promotor da ubiquitina do milho (*ubi-1*), representado pelo bloco em negrito, e o gene *bar* que codifica para fosfotricina acetiltransferase (BAR). B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; K, *Kpn*I; P, *Pst*I; Sa, *Sal*I; Sp, *Sph*I; X, *Xba*I.

Para a precipitação dos plasmídios na superfície das partículas de tungstênio, utilizou-se o mesmo protocolo descrito para otimização de parâmetros, só que agora adicionando-se os dois plasmídios na suspensão de disparo.

Após os disparos, os calos permaneceram por 16 horas no mesmo meio com potencial osmótico elevado (MS com 5% de água de coco, 3 mg/L de 2,4-D, 50 mg/L de arginina, manitol 0,4 M e sorbitol 0,4 M), sendo então transferidos para o meio anterior, sem manitol e sorbitol. Após 7 dias, os calos foram transferidos para meio seletivo (com geneticina).

3.8.1. Teste com geneticina

Após o período de estabilização (7 dias) dos calos em meio original (de TAYLOR *et al.*, 1992) iniciou-se o processo seletivo em meio contendo 30 mg/L de geneticina filtro-esterilizada, adicionada após autoclavagem do meio de cultura. Após 25 dias, os calos foram transferidos para meio de regeneração de plantas (sem 2,4-D), mantendo-se a concentração de geneticina. O tempo de regeneração de plantas foi variável, geralmente 30-40 dias. Não houve alteração do meio de cultura para enraizamento das plantas. A pressão seletiva foi mantida até o final da fase "in vitro", quando as plantas possivelmente resistentes eram transferidas para plantágios em casa de vegetação, utilizando o composto orgânico Plantmax (Eucatex Mineral Ltda.), à base de matéria orgânica e vermiculita.

3.8.2. Teste com kanamicina

As plantas selecionadas em genética que foram transferidas para casa de vegetação, após atingirem aproximadamente 30 cm de altura (cerca de duas semanas), passaram por um teste foliar com o antibiótico kanamicina, aplicado diretamente em um ferimento no limbo foliar, na concentração de 1%, para confirmar a resistência ao antibiótico. Neste teste, as folhas foram retiradas, deixando-se apenas a última folha aberta, que recebeu duas incisões laterais sem atingir a nervura central. Neste ferimento, foi aplicado um pedaço de papel de filtro embebido em solução de kanamicina 1% e tween-20 0,1% e, em seguida, envolveu-se a secção da folha juntamente com o papel, em um filme PVC, para evitar a evaporação rápida do antibiótico (ver Figura 6). As plantas que apresentaram nova brotação normal foram consideradas resistentes. A avaliação foi feita após 7 dias da aplicação da kanamicina. As plantas suscetíveis apresentavam as folhas jovens completamente cloróticas e secavam após alguns dias.

Figura 6. Teste foliar em casa de vegetação com o antibiótico kanamicina, aplicado diretamente sobre ferimento no limbo foliar, na concentração de 1%, em plantas de cana-de-açúcar, clone SP80-180, transformadas por biolística. O antibiótico é aplicado em papel absorvente sobre o ferimento e envolvido por um filme plástico para evitar evaporação e garantir a penetração.

3.8.3. Teste com glufosinato de amônio

As plantas que passaram pelos dois testes anteriores foram consideradas resistentes aos antibióticos, estando aptas a passarem pelo próximo teste, que consiste em determinar se também foi incorporada resistência ao herbicida glufosinato de amônio. Logo após a avaliação do teste foliar com kanamicina, as plantas foram submetidas à aplicação do herbicida comercial Finale® (AgrEvo), que tem o glufosinato de amônio como princípio ativo, na dosagem recomendada pelo fabricante: 60 mg de p.a. / m² (ou 0,3 ml do produto comercial / m²). Para aplicação, adicionou-se espalhante foliar Herbitensil (0,2 ml/m²) e utilizou-se um atomizador, para garantir aplicação em todas as folhas. Cuidou-se para que não houvesse irrigação nas 4 horas posteriores à aplicação do herbicida. A avaliação foi realizada sete dias após a aplicação. Após 10 dias, repetiu-se a aplicação do produto. As plantas que se mostraram resistentes após as duas aplicações foram transferidas para vasos de 20 cm de diâmetro e mantidas para multiplicação "in vitro" e posteriores análises moleculares.

3.9. Multiplicação "in vitro" das plantas resistentes

Seis plantas, das que se mostraram resistentes aos antibióticos e ao herbicida, foram multiplicadas através de cultura de ápices meristemáticos para verificar a manutenção da resistência após a micropropagação. Após corte dos palmitos contendo as regiões meristemáticas, procedeu-se a assepsia em solução de hipoclorito de cálcio (2%), lavagem em água destilada e esterilizada e retirada das

folhas, em câmara de fluxo laminar. Os ápices meristemáticos foram introduzidos em tubos de vidro contendo meio de cultura MS líquido, suplementado com cinetina ($5,4 \mu\text{M.l}^{-1}$). Após estabelecimento, estes explantes foram multiplicados por três subcultivos, dando origem às plantas que foram analisadas molecularmente para verificar manutenção dos transgenes.

3.10. Análises Moleculares

Para as análises moleculares que comprovam a transformação genética, foram necessárias extrações de DNA e preparo de sondas para hibridização (para análises Southern), extração de proteínas (para Western), bem como construção de cDNA a partir de RNA (RT-PCR). Estes protocolos são descritos a seguir.

Extração do DNA das plantas

Folhas jovens das plantas possivelmente transformadas, das micropropagadas e dos controles foram coletadas, acondicionadas em sacos plásticos e levadas à temperatura de -80°C . Após congelamento as folhas foram trituradas com nitrogênio líquido até a obtenção de 20 ml de um pó fino, que foi transferido para um tubo Falcon de 50 ml. Adicionou-se 25 ml de tampão de extração (500 mM NaCl; 100 mM de Tris-HCl pH 8,0; 50 mM de EDTA; 0,84% de SDS) contendo 0,38% de bissulfito de sódio, aquecido à 65°C . Após homogeneização com espátula de metal, as amostras foram incubadas à 65°C , por 30 minutos, invertendo-se os tubos a cada 5 minutos. Resfriou-se à temperatura ambiente e adicionou-se clorofórmio : álcool

isoamílico (24:1) até completar a marca de 45 ml no tubo, mantendo em agitação leve por 10 minutos. Centrifugou-se por 15 minutos à 3.000 rpm, para separação das fases. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos, adicionando-se etanol 95% (o dobro do volume recolhido do sobrenadante) e misturando-se para precipitar os ácidos nucleicos. Antes de resgatar o DNA, os tubos foram mantidos por 1 hora, à -20°C. Os DNAs foram retirados com um gancho de vidro e transferidos para tubos de 15 ml, contendo 10 ml de etanol 75% mantidos à temperatura de -20 °C. Os tubos foram mantidos à -20°C por 30 minutos, seguindo-se centrifugação por 10 minutos, à 3.000 rpm. Após descarte do etanol, os tubos foram invertidos sobre papel absorvente para secar os ácidos nucleicos. Estes foram dissolvidos em 200-500 µl de tampão TE, em banho maria à 65°C, por aproximadamente 30 minutos, ou até dissolver. Após nova centrifugação (10.000 rpm, 10 minutos), as suspensões contendo DNA foram transferidas para tubos eppendorf, sendo armazenados no freezer, à -20°C até a utilização (MCCOUCH *et al.*, 1988).

Teste de qualidade e quantificação das amostras

Para checar a qualidade das amostras de DNA e verificar se não houve degradação das mesmas, 4 µl de cada uma foram digeridos com enzima de restrição *EcoRI* (1 µl, 10 unidades/µl) em solução contendo 3 µl de espermidina; 3 µl de DTT; 3 µl de Tampão 10X; 1 µl de RNase (digestão por 4 horas, à 37°C). Após adição de 3 µl de "blue juice" (70% de glicerol; 100 mM de Tris-HCl; 20mM de EDTA; 0,2% de SDS; 2,5% de azul de bromofenol), cada amostra digerida foi corrida em gel de agarose 0,9%, ao lado de amostra não digerida para comparar os padrões de corrida.

Para quantificação, diluiu-se as amostras (1 μ l de amostra : 99 μ l de água) e digeriu-se com RNase (1 μ l / amostra diluída). Leitura em espectrofotômetro.

Preparo de sondas para hibridização

As sondas foram obtidas dos plasmídios utilizados nos disparos, a partir de digestão dos mesmos com enzimas de restrição. Para o plasmídio pHA9, segundo mapa de restrição apresentado na Figura 4, a enzima de restrição *Bam*HI cliva em dois sítios, gerando dois fragmentos: um contendo o gene de interesse (*neo*), com 844 pb e outro com 4899 pb. Para o plasmídio pAHC20, de acordo com o mapa de restrição representado na Figura 5, a enzima de restrição *Pst*I cliva em três fragmentos: um pequeno, contendo o gene de interesse (*bar*) com 562 pb, um com 2 kb, e um maior, com 3 kb.

Para digestão dos plasmídios, preparou-se a seguinte reação:

- 5 μ l do plasmídio (1 μ g/ μ l)
- 1 μ l (10 unidades/ μ l) da enzima de restrição (*Pst*I ou *Bam*HI)
- 2 μ l de tampão 10x
- 2 μ l de BSA
- 10 μ l de água

As reações foram incubadas à 37°C, por 5 horas e os fragmentos separados por eletroforese em um gel de agarose (0,9%) preparado com tampão TAE (1x). Após identificação dos fragmentos correspondentes aos genes, excisou-se os mesmos sobre luz UV.

Para purificação do DNA, utilizou-se o kit Geneclean® (Promega), que envolveu os seguintes passos:

- adição de solução de NaI 6M (1 ml / 400 g do gel excisado);
- dissolução em banho maria, à 50°C, por aproximadamente 5 minutos;
- adição de Glassmilk (1 μ l/ μ g de DNA);
- manutenção do glassmilk em suspensão, no gelo;
- centrifugação por 5 segundos, à 10.000 rpm;
- descarte do sobrenadante;
- lavagem do “pellet” com Wash New (solução contendo NaCl, etanol e água) mantido no freezer, e centrifugação, por 3 vezes;
- eluição do DNA em tampão TE (1 μ l/ μ l de Glassmilk utilizado).

Após determinação da concentração, as sondas foram armazenadas à -20°C.

Extração de proteínas

Semelhante à extração de DNA, folhas jovens de oito plantas resistentes aos antibióticos e ao herbicida (sendo duas resultantes de micropropagação) foram trituradas em nitrogênio líquido para obtenção de um pó fino. Adicionou-se 1 ml de tampão de extração (63 mM de Tris-HCl pH 7,0; 5% de mercaptoetanol; 2% de SDS; 10% de glicerol) em 300 mg de tecido triturado, homogeneizou-se e colocou-se em banho maria fervente durante 3 minutos, levando ao gelo em seguida. Centrifugou-se durante 10 minutos à 1.200 rpm e transferiu-se o sobrenadante para novo tubo. Armazenamento das amostras à -20°C (SAMBROOK *et al.*, 1989).

3.10.1. Confirmação da presença dos genes (Southern)

Para confirmação da presença dos genes introduzidos nas plantas realizou-se análise Southern, seguindo instruções de MCCOUCH *et al.* (1988). Para isto, amostras de DNA de 20 plantas transformadas e de cinco plantas de cada uma das seis micropropagadas foram digeridas com a enzima de restrição *EcoRI* (esta enzima cliva o plasmídeo pHA9 e o plasmídeo pAHC20 em dois sítios de restrição cada, gerando fragmentos de aproximadamente 1,7 e 1,4 kb, respectivamente).

Digestão para “blotting”

As reações para digestão foram preparadas em um volume total de 45 μl e constituídas de:

- amostra de DNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (20 μl)
- H_2O (4 μl)
- DTT (4 μl)
- Espermidina (4 μl)
- Tampão 10X (4 μl)
- RNase (1 μl)
- Enzima *EcoRI* (3 μl , sendo 10 unidades/ μl)
- Blue juice (5 μl)

O “blue juice” foi adicionado após incubação das reações à 37°C, por 16 horas. Gel de agarose (0, 9%) foi preparado em tampão TBE (1 M Tris-HCl, 10mM EDTA, 125 Mm NaAc.3H₂O) e corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml). Os 45 µl de cada reação foram aplicados no gel. Como marcador de peso molecular utilizou-se o λ-*Hind*III (DNA do lâmbda clivado com a enzima *Hind*III). A corrida eletroforética foi realizada em tampão TBE 1X por cerca de 16 horas, à 16 V.cm⁻¹. Os géis foram fotografados sobre luz UV.

“Blotting”

Após a eletroforese, os géis foram depurinados em HCl 0,25 N, sob agitação lenta por 10 minutos (ou até a linha azul escura do Bromofenol tornar-se amarela) e lavados com água destilada. Neutralizou-se a reação colocando os géis em NaOH 0,4 N até a linha amarela ficar azul novamente. Montou-se então o aparato para “blotting”. Membranas de nitrocelulose Hybond N+ foram cortadas no tamanho do gel e colocadas sobre este após embebição em NaOH 0,4 N, removendo-se as possíveis bolhas de ar com bastão de vidro. Duas folhas de papel Whatman foram também embebidas em NaOH e colocadas sobre cada membrana. Colocou-se a seguir um fardo de papel toalha, uma placa de acrílico e um peso de aproximadamente 500g. Este aparato permaneceu por 16 horas e então as membranas foram removidas e lavadas brevemente com 2X SSC. Estocou-se as membranas ainda úmidas entre polipropileno, em refrigerador.

Pré-hibridização

DNA de testículo de salmão (stDNA) foi fervido por 10 minutos e então colocado diretamente sobre gelo para esfriar. Aqueceu-se o tampão de hibridização (0,5M de Na_2PO_4 pH 7,2; 1% de BSA; 7% de SDS pH 7,0) à 65°C e colocou-se em garrafas apropriadas (40 ml/garrafa). Adicionou-se 400 μl de stDNA /40 ml de tampão de hibridização. As membranas foram colocadas cuidadosamente nas garrafas evitando-se a formação de bolhas de ar. Pré-hibridizou-se por no mínimo 4 horas, incubando-se à 65°C.

Preparo da sonda

Diluiu-se a sonda de DNA previamente preparada, na concentração adequada (cerca de 100 ng), que resultou em cerca de 10 μl para cada tubo. Aqueceu-se para desnaturar por 10 minutos e esfriou-se em seguida no gelo, por cerca de 5 minutos. Adicionou-se 11 μl de LS (25 partes de HEPES: 25 partes de DTM: 7 partes de oligonucleotídeos dATP, dTTP, dGTP) e 2 μl de Klenow (20 μl de 6 unidades/ μl de Klenow com 80 μl de glicerol 50% gelado), em capela radioativa. Manteve-se a mistura no gelo. Adicionou-se 3,5 μl de nucleotídeo com fósforo marcado [α - ^{32}P]dCTP, 250 μCi (Amersham Life Science) e incubou-se por no mínimo 1 hora à 37°C. Utilizou-se micro-colunas Probe Quant G-50 para retirar os nucleotídeos com fósforo não incorporados.

Hibridização

Adicionou-se 25 μ l de NaOH 0,4 N para desnaturar a sonda e manteve-se em agitação por 10 minutos, em temperatura ambiente. Adicionou-se 150-200 Kcounts de λ DNA para cada sonda (2 a 4 μ l) para marcar o padrão de referência utilizado nos géis de eletroforese. Adicionou-se as sondas às membranas e deixou-se hibridizando por no mínimo 20 horas, à 65°C.

Revelação

Após descarte apropriado do tampão de hibridização, as membranas foram lavadas em SSC, nas seguintes concentrações: 20X, 2X, 1X e 0,5X, sendo adicionado 5 ml de SDS (20%) para cada litro de solução de lavagem. Aqueceu-se as membranas à 65°C, por 20 minutos nas 3 últimas lavagens. Colocou-se então entre papel Whatman para secar o excesso de líquido. As membranas foram colocadas entre acetato e a radioatividade de cada uma foi determinada. Preparou-se os porta-filtros (cassetes) colocando-se o filme radiográfico (Kodak X-Omat) entre a membrana e a folha intensificadora (Ekran). Estes foram mantidos à -80°C para expor. Retirou-se os filmes dos cassetes após 1 dia (3000 cpm) até 10 dias (abaixo de 300 cpm). Após exposição, colocou-se em solução 0,5% SDS à 96°C, agitando-se por 5 minutos, para retirar a radioatividade. Para revelação, os filmes foram colocados em bandejas com solução reveladora (Kodak) por 3 minutos e a seguir, em solução fixadora (Kodak), por mais 3 minutos. Secagem ao ar.

3.10.2. Estimativa do número de cópias inseridas (Southern)

Para estimar o número de cópias do transgene que foram inseridas, procedeu-se a digestão dos DNAs genômicos e plasmidiais com enzimas de restrição que clivam o plasmídio em apenas um sítio de restrição. Para o gene *neo*, utilizou-se as enzimas *HindIII* e *BglII*, e para o gene *bar*, utilizou-se as enzimas *HindIII* e *BamHI*. O procedimento foi o mesmo descrito no item 3.10.1.. As digestões com as duas enzimas foram corridas em gel de agarose 0,9%, lado a lado para se estimar melhor o número de cópias inseridas.

3.10.3. Transcrição do gene *bar* (RT-PCR)

Para comprovar que o gene *bar* está sendo transcrito para o mRNA, escolheu-se 5 plantas para análise RT-PCR, sendo duas delas resultantes de micropropagação, mais a testemunha não transformada.

Extração do RNA:

Folhas jovens das plantas escolhidas foram trituradas em nitrogênio líquido, e 5 ml de pó fino de cada planta foram homogeneizados em 10 ml de tampão de extração (0,1 M de glicine-NaOH, pH 9,0; 50 mM de NaCl; 10 mM de EDTA; 2% de SDS; 1% de sarkosil; 0,1% de 2-mercaptoetanol). Adicionou-se 10 ml por amostra de fenol saturado para extração da proteína e, em seguida adicionou-se 10 ml de clorofórmio: isoamil (24:1) e emulsificou-se. Centrifugou-se por 20 minutos, à 3.500

rpm em centrífuga refrigerada à 4°C. Transferiu-se a fase aquosa para um tubo novo, repetiu-se o clorofórmio: isoamil e centrifugou-se novamente. Após transferência da fase aquosa para outro tubo, precipitou-se os ácidos nucleicos adicionando 1 ml de acetato de sódio 3M e 26 ml de etanol gelado, mantendo-se à -70°C, por 2 horas. Centrifugou-se novamente e desprezou-se o sobrenadante. Lavou-se o “pellet” com etanol 70% (cerca de 2 ml) e secou-se ao ar. O “pellet” foi dissolvido em água tratada com DEPC (livre de RNase) e tratado com DNase (1 unidade/ μ l), 1 μ l/10 μ l de solução contendo RNA. Incubação à 37°C, por 60 minutos. Adicionou-se novamente clorofórmio: isoamil (24:1) e emulsificou-se. Centrifugou-se por 20 minutos, à 3.500 rpm em centrífuga refrigerada à 4°C. Transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo e adicionou-se 1 ml de acetato de sódio 3M e 26 ml de etanol gelado, mantendo-se por duas horas à temperatura de -70°C. Centrifugou-se à 3500 rpm por 20 minutos e removeu-se o etanol com micropipeta. (O RNA sedimenta no fundo do tubo, enquanto a grande maioria dos oligodeoxiribonucleotídeos permanece em solução.) O “pellet” foi redissolvido em água com DEPC e a solução utilizada a seguir (SAMBROOK *et al.*, 1989, com modificações).

Transcriptase Reversa:

Em tubos eppendorf de 0,5 ml, no gelo, adicionou-se 1 μ l do ácido nucleico extraído anteriormente. Conforme protocolo do Kit Super Script Preamplification System (Gibco-BRL), optou-se por utilizar oligos(dT), que reconhecem sequências específicas do mRNA. Assim, adicionou-se 1 μ l de oligo(dT) (0,5 μ g/ μ l) e mais 10 μ l de água tratada com DEPC. Desnaturou-se as amostras à

70°C por 10 minutos e levou-se ao gelo por no mínimo 1 minuto. Adicionou-se então, 7 µl da seguinte mistura em cada amostra:

- tampão 10X para PCR (2 µl)
- 25 mM MgCl₂ (2 µl)
- 10 mM dNTP mix (1 µl)
- 0,1 M DTT (2 µl).

Incubou-se à 42°C, por 5 minutos e, em seguida adicionou-se 1 µl de transcriptase reversa (Super Script II RT - 200 unidades), misturou-se e incubou-se à 42°C, por 50 minutos, inativando-se a reação à 70°C por 15 minutos, esfriando-se em gelo. Em cada amostra, adicionou-se 1 µl de RNase e incubou-se por 20 minutos, à 37°C, obtendo-se desta maneira a primeira fita de cDNA para ser posteriormente amplificada por PCR. A Figura 7 mostra um esquema representativo deste sistema.

Figura 7. Resumo do sistema de obtenção da primeira fita de cDNA para ser posteriormente amplificada por PCR. (Kit SuperScript™, Gibco BRL).

Amplificação da primeira fita de cDNA por PCR:

Para amplificação da primeira fita de cDNA, utilizou-se apenas 10% da reação obtida no item anterior. Além das amostras de cDNA, uma reação foi feita com o plasmídeo pAHC20 na concentração de 15 ng/ μ l, ou seja, 30 ng/reação. Em tubos eppendorf de 0,2 ml adicionou-se:

- tampão PCR 10X (5 μ l)
- 25 mM MgCl₂ (3 μ l)
- 10 mM dNTP mix (1 μ l)
- 10 μ M primer 1 do gene *bar*: GGA.TCC.ATG.AGC.CCA.GAA (TOKI *et al.*, 1992) (1 μ l)
- 10 μ M primer 2 do gene *bar*: TCA.GAT.CTC.GGT.GAC.GGG.CA (TOKI *et al.*, 1992) (1 μ l)
- Taq DNA polimerase (Pharmacia)(2 unidades/ μ l) (0,5 μ l)
- cDNA (da reação anterior) (2 μ l)
- água destilada e autoclavada (36,5 μ l)

Depois de preparadas, as reações foram cobertas com aproximadamente 100 μ l de óleo mineral. Incubou-se à 94°C por 3 minutos para desnaturar o híbrido RNA/cDNA. A amplificação foi realizada em termociclador (MJ Research Thermocycler) programado para 40 ciclos de 1 minuto à 94°C, para denaturar o DNA, 2 minutos à 55°C, para anelamento dos primers, e 3 minutos à 72°C, para extensão. Ao final da reação, as amostras foram mantidas à 4°C.

Vinte e cinco μl de cada amostra amplificada foram analisados em eletroforese de gel de agarose 0,9% preparado com tampão TBE e corado com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g/ml}$). Foram adicionados 4 μl de azul de bromofenol (0,25%) por amostra. Como marcador de peso molecular utilizou-se o padrão pGem (Gibco-BRL). A corrida eletroforética foi realizada em tampão TBE 1X por cerca de 3 horas. O gel foi fotografado sobre luz UV. Os resultados podem ser vistos na Figura 27.

3.10.4. Expressão do gene *neo* (Western blot)

Para comprovar a expressão do gene *neo* nas plantas transformadas, utilizou-se a técnica Western blot. Para isso, foram escolhidas as mesmas plantas utilizadas na comprovação da transcrição do gene *bar*.

O método utilizado para extração das proteínas foi descrito no item 3.10. da página 56.

Quantificação de proteínas:

Para estimar a concentração de proteínas das amostras, utilizou-se o método de BRADFORD (1976). A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Multiskan EX), com absorbância de 595 nm.

Preparo do gel de poliacrilamida:

Utilizou-se o sistema SDS-PAGE. Preparou-se um gel 12% com 3,3 ml de água; 4,0 ml de acrilamida : bisacrilamida (28,2 : 0,8); 2,5 ml de 1,5 M Tris-HCl pH 8,8; 100 µl de SDS 20 %; 100 µl de persulfato de amônia e 4 µl de TEMED. Para formação de gradiente preparou-se um gel de empacotamento com a seguinte composição: 2,1 ml de água; 0,5 ml de acrilamida : bisacrilamida (28,2 : 0,8); 0,38 ml de 1,0 M Tris-HCl pH 6,8; 30 µl de SDS 20%; 30 µl de persulfato de amônia e 3 µl de TEMED. Antes da aplicação no gel de poliacrilamida, as amostras (10 µl) foram preparadas com 2 µl de azul de bromofenol em banho maria fervente por 10 minutos. Após resfriamento, aplicou-se as amostras mais o marcador de médio peso molecular no gel, com tampão de corrida (100 mM sulfato de sódio pH 7,2; 0,2% de SDS). Iniciou-se a corrida eletroforética à 70V, passando para 100V após atingir a diferença de concentração. Quando a frente azul de bromofenol atingiu o fim do gel, desligou-se a voltagem.

Western Blot:

Após a eletroforese, o gel foi incubado durante 30 minutos em tampão de transferência (48 mM Trizma base; 39 mM glicina; 0,04% SDS; 20% metanol). A seguir, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (MSI - 0,45 µ), por capilaridade, durante cerca de 20 horas. Após a transferência a membrana foi incubada durante 3 horas em TBS (0,1 M Trizma base; 0,9% NaCl, pH 7,5) contendo 5% de Skim milk. Posteriormente, as membranas foram incubadas durante 2 horas

em TBS contendo 0,1% de Tween 20; 5% de skim milk e o anticorpo (anticorpo policlonal para neomicina fosfotransferase II (NPT-II) - 5 Prime → 3 Prime, Inc.) na diluição de 1:1.000 (10 µl em 10 ml). Lavou-se a membrana 3 vezes por 10 minutos em TBS contendo 0,1% de Tween 20. Incubou-se a membrana por 1 hora em TBS contendo 0,1% de Tween-20; 5% de skim milk e o conjugado anti-coelho IgG com fosfatase alcalina, na diluição de 1:2.000 (5 µl em 10 ml). Repetiu-se a lavagem tripla e revelou-se em uma solução contendo Trizma base (12 mg); água destilada (500 ml) e pH 9,1, ajustado com HCl. Dissolveu-se 0,15 g de Naphtol-AS-phosphato em 2,5 ml de N,N dimetilformamida e adicionou-se à solução. Para incubação acrescentou-se 10 mg de Fast Blue BB e 50 µl de $MgCl_2$ (0,1M). A incubação levou cerca de 30 minutos, clarificando-se, a seguir em solução de hipoclorito de sódio 1%, por 15 minutos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Escolha da fase de cultivo de calos para bombardeamento

A escolha da fase de subcultivo de calos a ser utilizada nos bombardeamentos, foi baseada na quantidade de calos produzidos, na quantidade de plantas obtidas a partir destes calos e, finalmente, no tempo da cultura “in vitro”.

Embora as quantidades de calos e plantas tenham sido superiores na fase R3 (ver Tabela 1), optou-se por utilizar a fase R2 pela menor permanência do material em condições que favoreceriam variações somaclonais e pela razoável produção de calos embriogênicos, suficientes para a implantação de experimentos de transformação. Desta forma, visando também a padronização dos explantes utilizados, optou-se pela produção mensal de material “in vitro”, o que garante a constância e uniformidade no fornecimento de calos embriogênicos de boa qualidade. A escolha desta fase de subcultivo confirma o trabalho de BIRCH *et al.* (1995), que determinam cerca de 10 a 12 semanas para obtenção de calos com quantidade e qualidade para bombardeamento.

Tabela1. Escolha da fase de subcultivo para bombardeamento dos calos de cana-de-açúcar, clone SP80-180.

Fase de subcultivo	Porções de calos obtidas	Porções de calos cultivadas	Plantas obtidas	Plantas obtidas/ calos cultivados
R1	50	25 / 25 *	32	1,28
R2	315	125 / 125	160	1,28
R3	752	125 / 125	188	1,50
R4	504	125 / 125	63	0,50
R5	363	125 / 125	28	0,22

* Nesta fase, devido à pequena quantidade de calos embriogênicos obtidos, apenas 25 porções de calos foram cultivadas para regeneração e 25 foram mantidas para próxima fase. Nas demais fases, 125 porções foram colocadas para regenerar e 125 foram mantidas para próxima fase.

4.2. Otimização de Parâmetros

A transferência de genes pelo método biolístico, assim como pelos demais, necessita ser otimizada para cada condição e material vegetal. Em cana-de-açúcar, BIRCH *et al.* (1995) registraram um aumento de dez vezes na eficiência de transferência de genes em calos embriogênicos com a otimização das condições de bombardeamento, que segundo eles, corresponde a um aumento na frequência de transformação estável.

Para otimizar os parâmetros físicos do equipamento de transformação (Figura 1), foi utilizado o gene *gus* inserido no plasmídio pAHC27. Através da análise histoquímica da expressão GUS pôde-se quantificar os eventos de transformação em

cada tratamento de cada parâmetro analisado. Cada ponto azul foi considerado um evento de transformação, resultando em determinado número de eventos por área de calos expostos (Figura 3).

Observou-se uma certa irregularidade na distribuição dos pontos azuis em cada disparo, ocorrendo calos com número elevado de pontos por área e calos sem apresentar expressão.

4.2.1. Distância do alvo

Utilizando partículas de tungstênio M10 (1,0 μm de diâmetro, em média), com 1,0 μg de DNA por disparo, à 9 Kg/cm^2 , a distância do disparo entre as partículas e os calos embriogênicos, de acordo com os dados apresentados na Figura 8, não afetou significativamente o número de pontos azuis ($\alpha = 0,05$), embora haja decréscimo quando se utiliza grandes distâncias, como já citado por KLEIN *et al.* (1988) e RUSSEL *et al.* (1992). Neste, os autores verificaram que há um maior dano às células quando estas são colocadas muito próximas da fonte de partículas. BIRCH *et al.* (1995), utilizando um aparato semelhante, posicionaram o tecido alvo a uma distância de 16 cm da fonte de partículas. FINER *et al.* (1992), otimizando parâmetros de bombardeamento, também utilizaram condições iniciais fixas em culturas embriogênicas em suspensão de milho, e também constataram que não houve diferenças significativas entre as distâncias do alvo testadas. Estes autores utilizaram a análise histoquímica da expressão GUS como referência para a otimização do sistema, da mesma forma que RITALA *et al.* (1993), em cevada.

BROWN *et al.* (1994) constataram que a melhor eficiência de transferência foi obtida quando as amostras foram colocadas a uma distância de 19 cm, usando uma pressão de disparo de 7 Kg/cm², em um sistema semelhante ao utilizado neste trabalho. HÉBERT *et al.* (1993) também não encontraram diferenças entre as distâncias do tecido alvo em transformação de células em suspensão de videira, utilizando um protótipo do PDS 1000 (BioRad).

Figura 8. Otimização da distância do alvo para biolística em calos de cana-de-açúcar, clone SP80-180.

Médias com a mesma letra não diferem significativamente, ao nível de 5%. Barras verticais indicam desvio padrão das médias dos tratamentos. Os números representam médias de 6 repetições. Pressão de disparo utilizada: 9 Kg/cm².

4.2.2. Pressão de disparo

A pressão de disparo de 8 Kgf/cm², como mostra a Figura 9, foi significativamente superior às demais pressões testadas, com o número de pontos observado neste tratamento superando todos os tratamentos deste trabalho. FRANKS & BIRCH (1991) obtiveram expressões GUS similares utilizando pressões de disparo na ordem de 10, 12, 13 e 15 Kgf/cm².

Figura 9. Otimização da pressão de disparo para biolística em calos de cana-de-açúcar, clone SP80-180.

Médias com a mesma letra não diferem significativamente, ao nível de 5%. Barras verticais indicam desvio padrão das médias dos tratamentos. Os números representam médias de 6 repetições. Distância do alvo utilizada: 14 cm.

4.2.3. Quantidade de DNA

A quantidade de DNA utilizada nos disparos não se mostrou significativa para este experimento (Figura 10), ressaltando-se aqui que a homogeneização da suspensão de partículas parece influir mais na expressão do que a quantidade de DNA a ser empregada.

Figura 10. Otimização da quantidade de DNA para biolística em calos embriogênicos de cana-de-açúcar, clone SP80-180.

Médias com a mesma letra não diferem significativamente, ao nível de 5%. Barras verticais indicam desvio padrão das médias dos tratamentos. Os números representam médias de 6 repetições. Pressão de disparo utilizada: 9 kgf/cm². Distância do alvo utilizada: 14 cm.

Nos três parâmetros estudados, os desvios padrão das médias refletem as dificuldades de homogeneização da suspensão e padronização dos disparos. A grande variação observada nos resultados, entre bombardeamentos consecutivos usando tratamentos aparentemente idênticos (ver desvios padrão das médias de tratamentos apresentados nas Figuras 8, 9 e 10) parece ser uma característica comum de aparatos de transferência de genes via microprojéteis (por exemplo FRANKS & BIRCH, 1991; KLEIN *et al.*, 1988; SANFORD, 1988).

Em média, o sistema produziu cerca de 50 pontos azuis por cm² de calos, um número considerado baixo, mesmo para monocotiledôneas. Bombardeamento de calos embriogênicos de cana-de-açúcar, rotineiramente produzem 160-260 células positivas/cm² em ensaios de expressão GUS (BIRCH *et al.*, 1995). Para melhorar as condições de bombardeamento há necessidade de estudar a suspensão de partículas e uma forma de otimizar a homogeneização das mesmas, bem como do DNA precipitado na superfície. Outro cuidado que deve ser redobrado é com o DNA propriamente dito, mantendo-o sob condições ótimas de armazenamento.

CHOWDHURY & VASIL (1992) alertam para a importância do promotor utilizado no plasmídio, que afeta de forma significativa a eficiência de transformação. Os autores utilizaram o promotor 35S do CaMV (vírus do mosaico da couve-flor) para incorporar o gene *gus* em cana-de-açúcar e verificaram uma baixa expressão, quando comparada com trigo e milho. Um resultado similar também foi reportado por RATHUS & BIRCH (1992), que não detectaram expressão GUS após introdução de plasmídio contendo o 35S do CaMV como promotor, em protoplastos de cana-de-açúcar. GALLO-MEAGHER & IRVINE (1993) estudaram os efeitos de quatro tipos de promotores sobre a atividade GUS e chegaram a conclusões similares aos autores já

descritos. O promotor derivado da ubiquitina 1 do milho (Ubi-1), igual ao utilizado neste trabalho, mostrou-se superior ao recombinante Emu, ao actina 1 do arroz (Act1) e ao 35S do CaMV. O uso do promotor da ubiquitina do milho em transformação genética de monocotiledôneas tem aumentado a expressão dos genes de interesse, de forma que construções plasmidiais contendo este promotor já estão disponíveis (CHRISTENSEN & QUAIL, 1996).

4.3. Estabilidade da expressão GUS

A Figura 11 mostra a transitoriedade da expressão GUS, indicando que, após 4 dias, esta atividade foi reduzida pela metade, caindo até cerca de 80% com 15 dias.

Figura 11. Diminuição da expressão GUS ao longo do tempo em calos bombardeados de cana-de-açúcar, clone SP80-180.

Distância do alvo utilizada: 14 cm. Pressão de disparo utilizada: 9 Kgf/cm².

FRANKS & BIRCH (1991) também verificaram a transitoriedade da expressão GUS, quantificando os focos de expressão após 48 horas e após 14 dias. Apenas 4,4% dos focos azuis permaneceram. Na literatura estão reportadas taxas de menos de 1% (FINER & MCMULLEN, 1990) e 5% (KLEIN *et al.*, 1988) de conversão de expressão transiente para expressão estável. Neste trabalho, após 15 dias, apenas cerca de 1% da expressão foi mantida, e ao fim de 35 dias, só 0,02% de expressão GUS foi detectada. Esses resultados sugerem que a otimização de parâmetros utilizando a expressão GUS, deve ser feita com cautela, de maneira que a reação de fixação e coloração dos calos seja imediata aos disparos e padronizada em todos os tratamentos.

Outro alerta diz respeito ao número de experimentos necessários quando se visa a obtenção de plantas transformadas. Já que muitas células transformadas não se dividem, reduzindo a possibilidade de obtenção de plantas transformadas, deve-se trabalhar com grandes quantidades de calos.

A seguir estão sintetizados os resultados de otimização dos parâmetros que foram analisados para o clone SP80-180.

Tabela 2. Parâmetros otimizados em biolística para cana-de-açúcar, clone SP 80-180.

Parâmetros	Condições testadas	Ótimo
Distância entre amostra e partículas	5, 8, 11, 14, 17 cm ^{ns}	14 cm
Quantidade de DNA bombardeado	0,1 0,5 1,0 2,5 5,0 ug ^{ns}	1,0 ug
Pressão de disparo	7, 8, 9, 10, 11 Kgf/cm ² *	8 Kgf/cm ²
Expressão Transiente	1, 2, 4, 8, 12, 15, 20, 29 35 dias	1 dia

ns = Não significativo ao nível de 5%

* = Significativo ao nível de 5% (Teste Tukey)

4.4. Análise Microscópica

A análise microscópica do material bombardeado propicia uma visão mais detalhada do evento de transformação, mostrando o que acontece com as células após o disparo.

A Figura 12A mostra a localização das partículas de tungstênio na periferia do calo, à cerca de 5 camadas de células de profundidade, o que representa cerca de 200 μm . Verifica-se que há uma grande concentração de microprojéteis nas células maiores, que se concentram logo abaixo das duas camadas externas, compostas de células menores e em intensa divisão celular. Nas células mais internas do calo, aparentemente houve pouca penetração de partículas, talvez pela maior densidade, que confere uma maior resistência à penetração.

A Figura 12B apresenta mais detalhes, chamando atenção para a quantidade bastante elevada de partículas por célula (a seta indica um célula com cerca de 18 partículas inseridas). Este dado chamou atenção por não ter sido encontrado na literatura nenhum relato de tamanha quantidade. Outro detalhe que também pode ser observado é a irregularidade no tamanho das partículas, uma característica típica de microprojéteis de tungstênio (SANFORD *et al.*, 1993). Embora na literatura seja descrito como desvantagem das partículas de tungstênio, o fato delas se manterem aglomeradas, dificultando o bombardeamento uniforme (HUNOLD *et al.*, 1994), aqui, elas se mostraram bem distribuídas e individualizadas.

Figura 12. Localização, através de microscopia ótica com historesina, dos microprojéteis de tungstênio em células de calo embriogênico de cana-de-açúcar, clone SP80-180, bombardeado nas seguintes condições: distância de 11 cm da fonte, pressão de 8 Kgf/cm². **A.** Aumento de 200x. Observar localização das partículas na periferia do calo. **B.** Aumento de 320x. A seta indica uma célula com cerca de 18 partículas inseridas.

Outro dado que chama bastante atenção é a concentração das partículas no plasmalema e muito raramente no vacúolo ou no núcleo, talvez pela alta densidade deste último. Isso provavelmente explica o baixo número de células transformadas (ver resultados de expressão GUS em experimentos de otimização de parâmetros) em relação à quantidade de células atingidas. Segundo HUNOLD *et al.* (1994), em 90 % das células GUS-positivas foi detectada partícula dentro do seu núcleo. Para YAMASHITA *et al.* (1991), a expressão transiente das células parece corresponder àquelas em que a partícula atinge o núcleo. Além disso, nestas condições pode ocorrer uma grande mortalidade das células, seja pela toxidez causada pelo tungstênio, seja devido a danos mecânicos ocorridos na penetração das partículas na parede celular, plasmalema ou organelas (HUNOLD *et al.*, 1994).

O uso de manitol e sorbitol, recomendado por SANFORD *et al.* (1993) como agentes elevadores da pressão osmótica do meio de cultura de bombardeamento, parece ter tido efeito fundamental na prevenção de rupturas e vazamentos do conteúdo celular, frente à tamanha agressão física às células, bem como ter facilitado a penetração das partículas.

Como mostra a Figura 13, a microscopia eletrônica de varredura propicia uma visão detalhada da penetração do microprojétil através da parede celular. As dimensões do orifício indicam o tamanho da partícula. A relação entre o tamanho da célula e o tamanho da partícula está de acordo com o apresentado por SANFORD *et al.* (1993), que mostra como vantagem do uso de partículas de tungstênio, o pequeno tamanho, que permite seu emprego em células vegetais que normalmente medem de 20 a 100 μm .

Figura 13. Microscopia Eletrônica de Varredura. **A.** Detalhe da presença de possíveis microprojéteis na superfície de células de calos de cana-de-açúcar, clone SP80-180, após bombardeamento (aumento de 2000x). **B.** Provável orifício na parede celular provocado por microprojétil (aumento de 3400x).

4.5. Seleção em meio de cultura contendo geneticina

A Figura 14A mostra as diferenças entre os tratamentos, 15 dias após a introdução em meio (primeira avaliação). Houve oxidação e estagnação no crescimento dos calos, proporcionais às concentrações de geneticina. Na primeira avaliação não foi possível a caracterização dos calos como resistentes ou não à geneticina, já que nas doses de 15 e 30 mg/L ainda haviam calos com aspecto normal, com ligeira redução no desenvolvimento.

Em uma segunda avaliação, com 30 dias (Figura 14B), verificou-se estagnação e oxidação dos calos, proporcionais às doses do antibiótico, mas ainda não foi possível verificar se a capacidade de regeneração foi prejudicada. A transferência dos calos para uma concentração maior do agente seletivo acelerou o processo de oxidação. A Figura 15 mostra estes resultados em valores numéricos.

Figura 14. Avaliação do teste de sensibilidade de calos embriogênicos de cana-de-açúcar, clone SP80-180, ao antibiótico geneticina. **A.** Primeira avaliação, realizada 15 dias após a introdução dos calos em meio seletivo. **B.** Segunda avaliação, realizada após 30 dias.

Figura 15. Sensitividade de calos embriogênicos de cana-de-açúcar, clone SP80-180, ao antibiótico geneticina.

Médias de oito repetições, sendo uma repetição igual a uma placa com 10 porções de calos.

Apenas cerca de 40% dos calos apresentaram aspecto normal quando submetidos a 15 mg/L do antibiótico e menos de 20%, em 30 mg/L. Em termos quantitativos isso representa alteração em 90% dos calos submetidos a 15 mg/L e cerca de 95 % dos submetidos a 30 mg/L. A avaliação da capacidade de regeneração do material está representada na Figura 16.

Figura 16. Regeneração de plantas a partir de calos de cana-de-açúcar, clone SP80-180, em meio de cultura contendo geneticina.

Calos que foram mantidos em 15 mg/L desde o início, permitiram a regeneração de 10 plantas (20% em relação ao controle); já aqueles que foram submetidos a 15 mg/L por menos tempo, ao contrário do que se esperava, apresentaram efeito mais drástico na regeneração - apenas 2% de plantas regeneradas em relação ao controle. Nos demais tratamentos não houve sinal de regeneração.

A determinação da menor dose letal só foi possível após avaliação da perda da capacidade de regeneração. O resultado esperado, com base na literatura consultada (NEHRA *et al.*, 1994), era de uma dose letal mais elevada, entretanto, 30 mg/L foi suficiente para impedir a regeneração. É claro que a determinação da concentração do agente seletivo deve levar em consideração a resposta do material bombardeado e o sistema de transformação adotado. Em um sistema que produza

grande quantidade de material com possibilidade de transformação, a pressão seletiva deve ser maior, visando reduzir esforços e custos. Em cana-de-açúcar, para o clone estudado, é possível iniciar um esquema seletivo com 50 mg/L, desde que o material produza grande quantidade de calos embriogênicos. Para variedades que produzam poucos calos embriogênicos, uma alternativa é iniciar o processo seletivo com 15 mg/L e aumentar para 30 mg/L após uma ou duas transferências. Um eficiente sistema de seleção deve promover uma significativa redução na quantidade de material a ser manipulado, sem causar perda de células transformadas devido a compostos deletérios produzidos por células não transformadas. Como nas fases iniciais é difícil determinar se há ou não resistência, aconselha-se diminuir o período de crescimento dos calos para 20 dias, passando em seguida para meio de regeneração, sempre mantendo a pressão seletiva. Resumindo, nas condições apresentadas, a geneticina mostrou-se um eficiente agente seletivo. Resta saber se em condições específicas de bombardeamento para introdução do gene de resistência, este processo não apresenta uma alta porcentagem de escapes.

A kanamicina tem se mostrado pouco eficaz como agente seletivo em gramíneas, quando comparada a sua atuação em espécies dicotiledôneas. Seu uso nessas espécies tem sido desencorajado devido ao alto nível de resistência endógena e pela interferência na regeneração de células transformadas (HAUPTMANN *et al.*, 1988; NEHRA *et al.*, 1994). Para monocotiledôneas, a melhor opção é o antibiótico geneticina que, segundo NEHRA *et al.* (1994), não interfere no processo de regeneração e pode portanto, ser utilizado para seleção em estágios iniciais. Partindo desta referência, optou-se por utilizar o antibiótico geneticina no meio de cultura e confirmar a resistência em teste foliar com kanamicina, em casa de vegetação.

4.6. Co-transformação

Os resultados dos experimentos de co-transformação dos dois clones estudados estão sintetizados nas Tabelas 3 e 4. Para o clone SP82-3721 (Tabela 3), não se obteve plantas transformadas (resistentes ao antibiótico ou ao herbicida) de um total de 189 disparos. A justificativa para isso não está no sistema de transformação adotado, já que para o clone SP80-180 (Tabela 4) houve um sucesso considerável. O problema está na obtenção de calos com características embriogênicas. Como a produção deste tipo de calos neste clone é muito reduzida, optou-se por realizar uma seleção menos rigorosa dos calos, o que, provavelmente, levou ao bombardeamento de material com baixo potencial de regeneração de plantas. Segundo FRANKS & BIRCH (1991), células de calos friáveis e não morfogênicos são geralmente muito vacuoladas e devem sofrer maiores danos com a penetração de microprojéteis, tendo portanto, menor potencial para expressar o DNA exógeno.

A diferença na produção de calos embriogênicos apresentada por variedades de cana-de-açúcar, já foi discutida por BIRCH (1996), que relatou diferenças substanciais na eficiência de indução, proliferação, manutenção e regeneração de calos. Cabem, para o caso do clone SP82-3721, estudos específicos para otimizar a cultura de tecidos, alterando principalmente os níveis de fito-reguladores.

Discutindo ainda a Tabela 3, as 34 plantas que foram obtidas após seleção em meio de cultura contendo geneticina, são, muito provavelmente, escapes, já que não foram consideradas resistentes no teste seguinte, com kanamicina. A

presença de escapes na primeira seleção, realizada “in vitro”, com o antibiótico geneticina também foi verificada para o clone SP80-180 (Tabela 4). Entende-se por escapes deste teste, a diferença entre o número de plantas consideradas resistentes à geneticina e o número de plantas consideradas resistentes à kanamicina. Assim sendo, 523 plantas seriam consideradas escapes do teste “in vitro” (73%), um número bastante elevado. Se forem considerados apenas os 6 primeiros experimentos (1, 2, 4, 6, 8 e 10), o número de escapes cai para apenas 4 (3%). O número elevado de escapes apresentado nos experimentos 12, 14, 16, 17, 18, 19, 20 e 22 se justifica pela alteração que foi realizada no processo de seleção “in vitro” a partir do experimento 12. Suprimiu-se a fase de seleção em meio de cultura contendo 2,4-D e geneticina, levando-se os calos diretamente para meio de regeneração com geneticina, em uma tentativa de acelerar o processo “in vitro” e talvez, resgatar calos transformados que poderiam estar sendo prejudicados por permanência excessiva em presença de células mortas. Isto certamente possibilitou a regeneração de muitas plantas não transformadas, mesmo em presença do antibiótico.

Um detalhe de grande importância que deve ser mencionado é que as plantas que regeneraram e se multiplicaram “in vitro”, em presença da geneticina, ao serem transferidas para casa de vegetação, também passaram por multiplicação, gerando várias plantas, talvez provenientes de um mesmo calo e até de uma mesma célula. Logo, não houve controle sobre o número de eventos de transformação que geraram plantas transformadas (exceção feita ao experimento 1, onde 4 eventos deram origem às 43 plantas resistentes). Desta forma, os escapes também podem ter sido multiplicados, explicando assim o grande número apresentado.

Tabela 3. Resumo dos experimentos de co-transformação do clone SP82-3721.

Experimentos	Número de	N.de plantas	N.de plantas	N. de escapes	N.de plantas	N.de “escapes”
nº	disparos	resistentes à	resistentes à	do teste com	resistentes ao	do teste com
		geneticina	kanamicina	geneticina	herbicida	kanamicina
3	20	-	-	-	-	-
5	20	-	-	-	-	-
7	20	-	-	-	-	-
9	20	-	-	-	-	-
11	20	-	-	-	-	-
13	20	-	-	-	-	-
15	20	-	-	-	-	-
21	20	4	-	4 (100)	-	-
23	20	-	-	-	-	-
25	9	30	-	30 (100)	-	-
Total	189	34	-	34 (100)	-	-

Os números entre parênteses correspondem aos valores em porcentagem.

Tabela 4. Resumo dos experimentos de co-transformação do clone SP80-180.

Experimentos	Número de	N.de plantas	N.de plantas	N. de escapes	N.de plantas	N.de “escapes”
nº	disparos	resistentes à	resistentes à	do teste com	resistentes ao	do teste com
		geneticina	kanamicina	geneticina	herbicida	kanamicina
1	32	43	39	4 (9)	36	3 (7,7)
2	20	18	18	-	18	-
4	20	-	-	-	-	-
6	20	4	4	-	4	-
8	20	-	-	-	-	-
10	20	75	75	-	75	-
12	20	139	11	128 (92)	11	-
14	20	26	16	10 (4)	14	2 (12,5)
16	20	202	22	180 (89)	22	-
17	20	32	6	26 (81)	-	6 (100)
18	20	37	-	37 (100)	-	-
19	15	82	-	82 (100)	-	-
20	20	52	4	48 (92)	4	-
22	20	8	-	8 (100)	-	-
24	20	-	-	-	-	-
Total	307	718	195	523 (73)	184	11 (5,6)

Os números entre parênteses correspondem aos valores em porcentagem.

Considerando agora as plantas resultantes da aplicação de kanamicina no limbo foliar, verifica-se um número bastante inexpressivo de “escapes”. Apenas 5,64% das plantas consideradas resistentes à kanamicina não eram resistentes ao herbicida (ver resultado de aplicação de herbicida na Figura 17). Neste caso, há uma grande probabilidade dessas plantas terem sido transformadas apenas com o gene de resistência ao antibiótico (*neo*), ou seja, apenas um dos plasmídios (no caso, o pHA9) ter sido inserido no genoma. A única forma de confirmar esta hipótese seria uma análise molecular do material, antes de submetê-lo ao teste com o herbicida, mas isso não foi feito. Cabe ressaltar ainda, que nem todas as plantas que se mostraram resistentes ao herbicida são necessariamente co-transformadas. Nestas duas fases de seleção fenotípica (com kanamicina e com glufosinato de amônio) também podem ter ocorrido escapes. A única forma de confirmar isso é através de análises moleculares do genoma dessas plantas.

A eficiência de seleção apresentada pelo antibiótico geneticina nos 6 primeiros experimentos com o clone SP80-180 pode ser considerada alta, já que menos de 3% das plantas regeneradas neste esquema seletivo foram consideradas escapes. RITALA *et al.* (1993), utilizando a geneticina como agente seletivo em cevada (100 mg/L, por 6 semanas), mostraram freqüências de amostras *neo* positivas entre 93 e 100% do material considerado resistente ao antibiótico. BARCELO *et al.* (1994) confirmaram a presença do *neo* em 70% das plantas de *Tritordeum* (*Hordeum X Triticum*) selecionadas em meio contendo 50 mg/L de geneticina. Embora considerada pouco eficaz como agente seletivo em gramíneas, a kanamicina aplicada em teste foliar mostrou-se bastante eficiente. Este tipo de teste é de grande importância quando se deseja avaliar a herança do gene *neo* em progênies de plantas transformadas, como foi descrito por D'HALLUIN *et al.* (1992), em milho.

Figura 17. Resultado de aplicação de herbicida glufosinato de amônio (produto comercial Finale) em plantas transformadas de cana-de-açúcar, clone SP80-180. À esquerda, plantas que não apresentaram resistência. À direita, plantas transgênicas para o gene *bar*.

4.7. Análises moleculares

Análises moleculares de materiais transformados, geralmente são realizadas por duas razões: primeiro, para determinar se o material é ou não transgênico e segundo, para caracterizar esse material, determinando por exemplo, o número de cópias do transgene e/ou a complexidade da inserção e avaliar a expressão do mesmo. Existe atualmente, uma grande variedade de ferramentas para esse tipo de análise, algumas de uso bastante comum, mas pouca atenção tem sido dada para descrever os tipos de análises que possam ser empregados para responder às questões pertinentes ao processo de transformação (REGISTER III, 1997).

Hibridização Southern é uma das mais poderosas ferramentas disponíveis para identificação e caracterização molecular de plantas transgênicas. Dependendo de como as digestões enzimáticas são conduzidas, pode-se obter informações preciosas sobre a complexidade da inserção do transgene e número de cópias (REGISTER III, 1997).

Embora o gene *neo* tenha sido utilizado apenas como instrumento para selecionar o material transformado “in vitro”, optou-se por realizar análises moleculares que confirmassem a presença do mesmo no genoma destas plantas, bem como estimassem o número de cópias inseridas. Isso traz informações importantes sobre a co-transformação, ou seja, o bombardeamento de dois genes localizados em vetores diferentes, estratégia utilizada neste trabalho.

Segundo REGISTER III (1997), prova indiscutível da integração de um transgene no genoma de uma planta é a Herança Mendeliana ou a clonagem do DNA da junção entre o vetor e a planta.

Apesar de se reconhecer a importância da análise de progênies de plantas transgênicas, como garantia de não silenciamento do transgene, a ausência de leis específicas de biossegurança no país, no período de realização dos experimentos, impediram a instalação do material em campo para cruzamentos e coleta de resultados em tempo hábil.

Como forma de amenizar esta ausência, optou-se por analisar plantas obtidas por micropropagação (cultura de ápices meristemáticos) das plantas transformadas. Sendo a cultura da cana-de-açúcar propagada vegetativamente na prática, a avaliação de material resultante de sucessivos ciclos de micropropagação, fornece a comprovação de que a planta transformada é capaz de transferir o transgene para as plantas regeneradas por propagação vegetativa, ou ainda, que a planta transformada pode suportar nova passagem “in vitro”.

Esclarecida esta questão, são apresentados a seguir, os resultados de análise Southern em 20 plantas transformadas e em 5 plantas micropropagadas de cada uma de 6 transformadas escolhidas ao acaso.

4.7.1. Confirmação da presença dos genes (Southern blot)

Observando a Figura 18, é possível comprovar a presença do gene *neo* em 19 das 20 plantas analisadas. A banda marcada corresponde ao inserto de aproximadamente 1719 pb, gerado por clivagem com a enzima de restrição *EcoRI* (ver mapa de restrição na Figura 4). Como esta enzima cliva duas vezes dentro do plasmídio, gera sempre um fragmento do mesmo tamanho e a banda marcada terá sempre a mesma posição no gel. Porém, é possível verificar diferenças nas intensidades das bandas, o que sugere diferentes números de cópias inseridas. Este fato será discutido oportunamente.

A Figura 19 mostra o mesmo resultado para as 30 plantas obtidas de micropropagação, mostrando que o transgene manteve-se inalterado quando comparado às plantas de origem (primeira amostra de cada grupo de 6).

A planta 2 que, como mostra a Figura 18, não apresentou a banda correspondente ao gene *neo*, pode ser resultado de um escape dos testes fenotípicos com antibióticos, ou pode apresentar certa resistência endógena ao mesmo. No mesmo teste realizado para o gene *bar* (Figura 20), verificou-se a incorporação genética da resistência ao herbicida, mostrando que, para esta planta, houve incorporação apenas do plasmídio pAHC20, e não do pHA9. Nesta análise, todas as 20 plantas mostraram-se transformadas para este gene, como mostra a presença da banda de aproximadamente 1313 pb, gerada por clivagem com a enzima *EcoRI*. O mesmo resultado foi verificado nas plantas micropropagadas, como mostra a Figura 21.

Figura 18. Análise Southern para certificar-se da presença do gene *neo* em plantas transformadas de cana-de-açúcar, clone SP80-180. As amostras de DNA genômico foram clivadas com a enzima de restrição *EcoRI*, gerando um fragmento contendo o gene de interesse de aproximadamente 1,7 kb. O gene *neo*, com 844 pb, extraído do plasmídeo pHA9, foi utilizado como sonda na hibridização. A coluna T refere-se à testemunha não transformada. As colunas de 1 a 20 correspondem às plantas que foram bombardeadas. Com exceção da planta 2 todas as demais apresentaram o gene *neo* inserido no genoma (indicado pela seta).

Figura 19. Análise Southern para detectar a presença do gene *neo* em plantas regeneradas por micropropagação de plantas transformadas. Clivagem com a enzima de restrição *EcoRI*, gerando fragmento com o gene *neo* de aproximadamente 1,7 kb. O gene *neo*, com 844 pb, extraído do plasmídeo pAH9, foi utilizado como sonda na hibridização. A coluna P refere-se ao plasmídeo pAH9. A coluna T refere-se à testemunha não transformada. As colunas 6, 10, 14, 17, 19 e 20 referem-se às plantas transformadas originais e as demais, posicionadas em sequência à direita, são as regenerantes de 3 ciclos de micropropagação. A seta indica a presença do gene. Maiores detalhes podem ser obtidos no texto.

Figura 20. Análise Southern para certificar-se da presença do gene *bar* em plantas transformadas de cana-de-açúcar, clone SP80-180. As amostras de DNA genômico foram clivadas com a enzima de restrição *EcoRI*, gerando um fragmento contendo o gene de interesse de aproximadamente 1,5 kb. O gene *bar*, com 562 pb, extraído do plasmídio pAHC20, foi utilizado como sonda na hibridização. A coluna T refere-se à testemunha não transformada. As colunas de 1 a 20 referem-se às plantas bombardeadas com o gene *bar*. A seta indica o fragmento contendo o gene de interesse.

Figura 21. Análise Southern para detectar a presença do gene *bar* em plantas obtidas por micropropagação de plantas transformadas. Clivagem com a enzima de restrição *EcoRI*, gerando fragmento com o gene *bar* de aproximadamente 1,5 kb. O gene *bar*, com 562 pb, extraído do plasmídeo pAHC20, foi utilizado como sonda na hibridização. A coluna P refere-se ao plasmídeo pAHC20. A coluna T refere-se à testemunha não transformada. As colunas 6, 10, 14, 17, 19 e 20 referem-se às plantas transformadas originais e as demais, posicionadas em sequência à direita, são as regenerantes de 3 ciclos de micropropagação. A seta indica a presença do gene. Maiores detalhes podem ser obtidos no texto.

Tanto na Figura 18 quanto na 20 é possível verificar que algumas plantas (3, 12, 13 e 15) apresentaram duas bandas ao invés de uma correspondente aos fragmentos esperados de 1719 e 1313 pb (para o gene *neo* e o gene *bar*, respectivamente). Algumas especulações foram geradas a partir desta observação, mas principalmente a possibilidade de rearranjos. Segundo REGISTER III (1997), bandas amostradas de tamanho diferente do esperado são consideradas rearranjos, entretanto, este tipo de análise não os caracteriza. Para casos em que uma das bandas é referente a um fragmento maior que o esperado, há a possibilidade de incorporação de mais de uma cópia em sequência, em configurações que poderiam ser “head-to-head”, “tail-to-tail” ou “head-to-tail”. Para as bandas referentes aos fragmentos menores (localizadas em posições abaixo da esperada), supõe-se que houve inserção de apenas parte do fragmento, ou seja, que houve clivagem dentro do fragmento, em outro sítio de restrição. As bandas de maiores pesos moleculares, presentes principalmente na análise para detectar a presença do gene *bar* (Figura 20), foram consideradas hibridizações não específicas, já que estão presentes também na testemunha não transformada. Outra possibilidade seria a digestão parcial do DNA genômico, gerando fragmentos maiores do que o esperado.

Este tipo de análise em cana-de-açúcar apresenta dificuldades quanto à qualidade dos resultados. O genoma desta espécie é bastante complexo e hibridizações não específicas são comuns. (Dr. Jorge Alberto da Silva, comunicação pessoal).

4.7.2. Estimativa do número de cópias inseridas no genoma

A análise Southern, utilizada para fornecer evidências de integração em múltiplos sítios, é mais confiável quando o material analisado foi produzido por transformação indireta, utilizando *Agrobacterium*. Neste caso, o T-DNA da borda direita produz uma junção tipicamente definida entre o vetor e a planta, e múltiplas bandas significam múltiplos sítios de inserção. A situação é menos confiável para material produzido por transformação direta (eletroporação ou biolística), já que as junções entre o DNA genômico e o vetor são ao acaso. Mesmo assim, uma alternativa aceitável é utilizar uma enzima de restrição que clive apenas em um sítio dentro do vetor. Esta técnica tende a produzir fragmentos de diferentes tamanhos fornecendo uma estimativa do número de cópias inseridas, mas não descarta a possibilidade de rearranjos dentro do transgene ou multimerização dos sítios de inserção (REGISTER III, 1997).

A utilização de enzimas de restrição que clivam os plasmídios em apenas um sítio de restrição gera fragmentos contendo o transgene com diferentes tamanhos, diferente do que ocorre quando se cliva com *EcoRI*, por exemplo, que gera fragmentos idênticos. Isso permite uma estimativa do número de cópias inseridas por genoma, mas não permite informações precisas, já que não há como verificar nesta análise, se dentro do fragmento cortado pela enzima há apenas uma cópia do transgene, ou mais cópias alinhadas em diferentes configurações.

Na quantificação do número de cópias do gene *neo* inseridas no genoma (Figura 22), verificou-se que as mesmas plantas que apresentaram sinais duplos nas análises anteriores (3, 12, 13 e 15), apresentaram 3 bandas em clivagem com duas enzimas de restrição, *HindIII* e *BglII*, separadamente. Isso garante certa confiabilidade, já que o resultado foi o mesmo nos dois padrões de restrição.

As plantas 1, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 16, 17, 18, 19 e 20 apresentaram 2 bandas nos dois padrões enzimáticos e, provavelmente, referem-se a um único evento de transformação, que foi multiplicado durante a seleção e a regeneração “in vitro”, já que as bandas estão localizadas na mesma posição.

Apenas as plantas 4 e 5 apresentaram uma única banda ou cópia inserida, constituindo talvez, outro evento de transformação. Desta forma, as 20 plantas analisadas para verificar a incorporação do gene *neo* no genoma são provavelmente resultantes de apenas 3 eventos de transformação. Mas não é possível afirmar isso com certeza, uma vez que a inserção de genes no genoma é um acontecimento bastante complexo, que envolve atividades enzimáticas, gerando quebras e incorporações difíceis de se identificar. Além disso, quando ocorre o disparo, o plasmídeo, preparado em sua forma circular na suspensão, se abre em local inespecífico e se fixa também de forma inespecífica no genoma vegetal. Logo, é difícil precisar o que ocorre em termos de número de cópias e posição de inserção, já que deleções e translocações também são passíveis de ocorrer.

Figura 22. Análise Southern para estimar o número de cópias do gene *neo* que foram inseridas nas plantas transformadas. Amostras de DNA genômico foram clivadas com as enzimas de restrição *Hind*III (H) e *Bgl*II (Bg), gerando fragmentos de tamanhos variáveis, já que estas enzimas clivam o vetor em apenas um sítio de restrição. O gene *neo*, com 844 pb, extraído do plasmídeo pHA9, foi utilizado como sonda na hibridização. A coluna T refere-se à testemunha não transformada. As colunas duplas de 1 a 20 referem-se às plantas transformadas. A planta número 2 não apresentou a banda correspondente ao gene. A estimativa do número de cópias inseridas foi a mesma nos dois padrões enzimáticos. As planta 4 e 5 tiveram inserção de uma cópia, as plantas 1, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 16, 17, 18, 19 e 20 tiveram duas cópias, e as plantas 3, 12, 13 e 15 tiveram três cópias inseridas.

A utilização de plasmídios previamente clivados no preparo das suspensões de disparo talvez contribuisse para a compreensão dos resultados, já que seria possível estimar o tipo de configuração no caso de inserções em tandem ou em sequência. Esse recurso de clivagem prévia do plasmídio, foi utilizado por D'HALLUIN *et al.* (1992) na eletroporação de células de milho.

As plantas escolhidas para micropropagação originaram-se talvez de um único evento de transformação que foi multiplicado durante o estágio “in vitro”.

Neste evento, é possível que tenha ocorrido a inserção de 2 cópias do gene *neo*. Esta mesma estimativa é feita para as plantas micropropagadas que, como mostra a Figura 23, também apresentam duas bandas de aproximadamente 6 kb.

Os tamanhos desses fragmentos aproximam-se do tamanho do próprio vetor, que possui 5,7 kb. Isso talvez se justifique pelas enzimas escolhidas para digestão. *HindIII* e *BglII* provavelmente possuem uma frequência similar de sítios de restrição ao longo do genoma vegetal, pois estes sítios se constituem de 6 pares de bases, igual a todas as enzimas de restrição utilizadas neste trabalho.

Figura 23. Análise Southern para estimar o número de cópias do gene *neo* inseridas no genoma de plantas obtidas por micropropagação de plantas transformadas. As amostras do DNA genômico foram clivadas com a enzima de restrição *Hind*III, que cliva o vetor em apenas um sítio de restrição, gerando assim, fragmentos de tamanhos variáveis. O gene *neo*, com 844 pb, extraído do plasmídeo pHA9, foi utilizado como sonda na hibridização. A coluna T refere-se à testemunha não transformada. As colunas 6, 10, 14, 17, 19 e 20 referem-se às plantas transformadas originais e as demais, posicionadas em seqüência à direita, são as regenerantes de 3 ciclos de micropropagação. Todas as plantas apresentaram uma estimativa de duas cópias inseridas. A seta indica fragmentos de aproximadamente 6 kb, que se aproximam do tamanho do vetor (5,7 kb).

Para a estimativa do número de cópias do gene *bar* inseridas no genoma, a Figura 24, mostra resultado condizente com aquele apresentado para o gene *neo*, confirmando a co-transformação. As plantas 3, 12, 13 e 15, também neste caso, apresentaram três bandas nos dois padrões de restrição (*HindIII* e *BamHI*), reforçando a hipótese de se tratar de um mesmo evento de transformação. As plantas 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 16, 17, 18, 19 e 20 apresentaram duas bandas, embora não pertençam necessariamente a um único evento (as plantas 4, 5 e 8 mostraram padrões diferentes das demais). Houve certa dificuldade na identificação das bandas nesta figura, principalmente nas plantas 1, 2, 8, 10, 11 e 15, porque a marcação ficou muito fraca, mas, mesmo assim, confrontando com outras radiografias foi possível estimar os números de cópias.

Para as plantas micropropagadas, também as estimativas do padrão de inserção permaneceram inalteradas (Figura 25).

Embora tenha sido possível comprovar a presença dos genes no genoma das plantas transformadas e tecer considerações sobre o número de cópias inseridas no genoma, nota-se que as fotografias apresentadas não possuem boa qualidade. Parte deste problema credita-se à própria cultura que apresenta dificuldades com análises deste tipo devido à complexidade do genoma. Por outro lado, houve dificuldades em acertar a concentração adequada dos plasmídios que eram utilizados como marcadores. Em algumas figuras as marcas ficaram muito fortes e em outras muito fracas. Em alguns casos, a distinção de bandas muito próximas na radiografia não apresentou problemas, mas quando foram transferidas para o papel perderam a distinção. Foi o caso das Figuras 22 e 23.

Figura 24. Análise Southern para estimar o número de cópias do gene *bar* que foram inseridas nas plantas transformadas. Amostras de DNA genômico foram clivadas com as enzimas de restrição *Hind*III (H) e *Bam*HI (Ba), gerando fragmentos de tamanhos variáveis, já que estas enzimas clivam o vetor em apenas um sítio de restrição. O gene *bar*, com 562 pb, extraído do plasmídeo pAHC20, foi utilizado como sonda na hibridização. A coluna T refere-se à testemunha não transformada. As colunas duplas de 1 a 20 referem-se às plantas transformadas. A estimativa do número de cópias inseridas foi a mesma nos dois padrões de restrição. As plantas 3, 12, 13 e 15 tiveram três cópias inseridas. As demais, apresentaram duas cópias, sendo que as plantas 4, 5 e 8 apresentaram padrões diferentes das demais. Maiores detalhes são encontrados no texto.

Figura 25. Análise Southern para estimar o número de cópias do gene *bar* inseridas no genoma de plantas obtidas por micropropagação de plantas transformadas. As amostras do DNA genômico foram digeridas com a enzima de restrição *Hind*III, que cliva o vetor em apenas um sítio de restrição, gerando assim, fragmentos de tamanhos variáveis. O gene *bar*, com 562 pb, extraído do plasmídeo pAHC20, foi utilizado como sonda na hibridização. A coluna T refere-se à testemunha não transformada. As colunas 6, 10, 14, 17, 19 e 20 referem-se às plantas transformadas originais e as demais, posicionadas em seqüência à direita, são as regenerantes de 3 ciclos de micropropagação. Todas as plantas apresentaram uma estimativa de duas cópias inseridas. A seta indica fragmentos de aproximadamente 6 kb, que se aproximam do tamanho de vetor (5,6 kb).

4.7.3. Análise da expressão do gene *neo* (Western blot)

Análise de expressão do transgene tem por objetivo verificar se RNA ou proteína se acumularam na planta transformada, ou seja, se houve transcrição do DNA em RNA ou tradução do RNA em proteína. Os imunoenaios são os métodos mais comumente utilizados para estudar o acúmulo de proteínas em plantas transgênicas, sendo Western blot e ELISA os preferidos (REGISTER III, 1997).

A Figura 26 mostra os resultados da análise Western realizada em sete plantas transformadas, sendo duas (6a e 10a) obtidas por micropropagação das plantas 6 e 10. Como controle positivo utilizou-se a bactéria DH5 α , onde o plasmídeo pHA9 foi clonado, e como controle negativo, a testemunha não transformada.

Comprovando o resultado obtido na análise Southern, a planta 2 não apresentou a proteína NPT-II. A presença de “background”, segundo REGISTER III (1997), é devido a interação específica do anticorpo com proteínas do extrato ou a interações inespecíficas.

Figura 26. Análise Western para comprovar a expressão do gene *neo* a nível de proteínas, em plantas transformadas de cana-de-açúcar, clone SP80-180. A coluna M representa o marcador de médio peso molecular. A coluna B corresponde à bactéria DH5 α , onde o plasmídio pHA9 foi clonado. A coluna T corresponde à testemunha não transformada. As demais referem-se a plantas transformadas, com exceção da planta 2 que, comprovando as análises Southern, não teve o gene *neo* incorporado ao genoma. A seta indica proteína neomicina fosfotransferase (NPT-II), de aproximadamente 29 ku.

4.7.4. Análise da expressão do gene *bar* (RT-PCR)

Segundo REGISTER III (1997), quando a análise de proteínas não é possível ou fornece dados inesperados, a análise do RNA transcrito é frequentemente utilizada, podendo fornecer dados sobre acúmulo de transcritos, explicando a presença de fenótipos inesperados. Técnicas como a transcrição reversa (RT-PCR), Northern e ensaios de proteção de ribonuclease (RPA) podem ser utilizadas para verificar a presença de um transcrito específico.

Para comprovar a expressão do gene *bar* não foi possível realizar análise Western porque não havia disponibilidade do anticorpo para fosfinotricina acetiltransferase. Com a disponibilidade de primers deste gene, foi possível realizar a transcrição reversa (RT-PCR).

A Figura 27 apresenta os resultados desta análise, realizada em cinco plantas transformadas, sendo duas micropropagadas (6a e 10a). Todas as amostras mostraram produção do RNA específico.

Figura 27. Análise RT-PCR em plantas transformadas de cana-de-açúcar, clone SP80-180, para comprovar a expressão do transgene *bar* a nível de transcrição em mRNA . A coluna M corresponde ao marcador molecular pGem. A coluna P representa o controle positivo – o plasmídio pAHC20. A coluna T refere-se à testemunha não transformada. As demais referem-se a plantas transformadas. A seta indica fragmento de aproximadamente 0,3 kb correspondente ao gene *bar*.

4.8. Discussão Geral

Para a escolha do explante a ser utilizado nos bombardeamentos, as principais preocupações eram com a quantidade de material, o tempo de permanência “in vitro” (que se justifica pela possibilidade de ocorrência de variação somaclonal), e a capacidade de regeneração de plantas. A bibliografia consultada mostrou que os calos embriogênicos eram o explante mais adequado. Coube então, avaliar qual seria a melhor fase para realizar os ensaios biolísticos.

De maneira geral, a fase de obtenção dos calos não apresentou problemas, exceto quanto às diferenças entre genótipos na produção destes. A razão de não se ter conseguido plantas transformadas do clone SP82-3721 foi creditada à incapacidade deste clone em produzir calos embriogênicos em quantidade suficiente, nas condições deste trabalho. Esta pode ser uma barreira a ser transposta quando se desejar a transformação de clones específicos, mas acredita-se que alterações relativamente simples em meios de cultura de indução e cultivo de calos possam solucionar o problema.

Quanto à otimização dos parâmetros de bombardeamento, cabe repetir, é específica para cada condição. Para o aparato utilizado neste trabalho, esperava-se diferenças mais significativas dentro dos parâmetros testados. Os resultados obtidos, de certa forma vieram reforçar a tese de que o sucesso da transformação genética via biolística depende antes do material vegetal utilizado como alvo, que das condições de bombardeamento.

A redução da expressão GUS ao longo do tempo (item 4.3) justifica o número reduzido de eventos de transformação, utilizando esta técnica. Muitas células são atingida (transformadas), mas poucas sobrevivem e se dividem, gerando plantas, daí a necessidade de se trabalhar com grandes quantidades de explantes.

A análise histológica dos calos embriogênicos bombardeados permitiu melhor compreensão do evento, já que forneceu a exata localização das partículas nas células. Constatou-se que as partículas de tungstênio penetraram até determinada profundidade nos calos e que o número de partículas que atingem as células é muitas vezes excessivo, resultando em possível morte das mesmas.

Embora a incorporação de resistência a herbicida apresente certa importância agrônômica para a cultura, ela não foi o objetivo principal deste trabalho. O interesse principal foi viabilizar a biolística como método de transformação genética para a cultura, que pudesse ser incorporado em programas de melhoramento. Assim, a resistência a herbicida foi mais um mecanismo que um objetivo.

Quando se trabalha com genes de resistência a herbicidas, há possibilidade de que os mesmos possam ser utilizados como genes marcadores, facilitando o processo de seleção dos transformantes. Mas, além do fato de serem reportados na literatura como pouco eficazes, para este trabalho era mais interessante testar outro gene marcador (aqui empregado em outro vetor, caracterizando a co-transformação), já pensando na possibilidade de se trabalhar com outros genes de interesse agrônômico.

A escolha do gene *neo* como marcador e da geneticina como agente seletivo baseou-se na bibliografia consultada e na disponibilidade do plasmídio pHA9, que contém um bom promotor para cana-de-açúcar (*ubi-1*).

Estudos da concentração ideal do agente seletivo no meio de cultura revelaram que não houve necessidade de doses elevadas para inibir o desenvolvimento de calos não transformados. Além disso, o esquema seletivo aqui proposto, permite certa flexibilidade tanto nas concentrações utilizadas quanto no tempo de permanência em cada meio de cultura utilizado. O uso de bom senso e observação constante do material definem qual o melhor procedimento na seleção.

Os testes foliares com kanamicina serviram não apenas para confirmar a seleção em genética, mas também para testar uma forma rápida de analisar plantas em casa de vegetação.

Quanto ao bombardeamento propriamente dito, uma vez estabelecidos os parâmetros, é uma técnica relativamente simples, que não consome muito tempo, mas que requer atenção especial com a suspensão utilizada no disparo.

Um procedimento que poderia ter facilitado as análises moleculares, mas que não foi utilizado, é a digestão prévia dos plasmídios com uma enzima de restrição que o clive em apenas um sítio de restrição. Com isso, os DNAs plasmidiais assumiriam a forma linear e seria possível fazer estimativas mais precisas de números de cópias inseridas e de configurações assumidas dentro do genoma.

Na regeneração de plantas transformadas, embora o sistema de seleção adotado tenha sido eficiente, o monitoramento dos calos e das plantas não foi o mais adequado, já que não individualizou totalmente os eventos de transformação. Isso fez com que informações importantes como o número de plantas transformadas obtidas por disparos fossem perdidas.

Uma justificativa para isso é a quantidade excessiva de materiais manipulados, que impossibilitou o acompanhamento individualizado dos calos bombardeados e das plantas regeneradas. Provavelmente, muitas plantas que passaram por análises moleculares eram, na verdade, oriundas de um mesmo evento.

A multiplicação “in vitro” das plantas transformadas foi a maneira encontrada para minimizar a falta de análises nas progênies das plantas transformadas. Como já foi justificado, não foi possível realizar testes nas progênies por vários motivos, mas, em se tratando de espécie de propagação vegetativa e a micropropagação sendo um método utilizado na prática nesta cultura, optou-se por analisar as plantas micropropagadas.

Certamente, se as plantas escolhidas para micropropagação se originassem de eventos diferentes, os resultados seriam mais ricos em informações mas, infelizmente, quando se iniciou a cultura de ápices meristemáticos, ainda não eram conhecidos os resultados das análises Southern que distinguiram os eventos. Assim, as seis plantas micropropagadas eram oriundas de uma mesma planta (ou célula) transformada.

Com base em todos os resultados apresentados, além da viabilidade da técnica de transformação genética em cana-de-açúcar, pode-se verificar que não foram obtidos dados que indicassem a ocorrência de silenciamento de genes, pelo menos nas plantas que foram analisadas molecularmente. Uma única planta analisada não mostrou integração de um dos genes no genoma, mas apresentou o outro gene, indicando que co-transformação não significa necessariamente co-expressão.

Como esta planta apresentou-se resistente nos dois testes fenotípicos com o antibiótico, especula-se a possibilidade deste gene ter-se integrado ao genoma e ter expressado a nível de proteína, mas por algum motivo ter sido excluído do genoma. Segundo STAM *et al.* (1997), não se sabe como o DNA é reconhecido como sendo “estranho”, mas deve estar relacionado ao conteúdo relativo de adenina-timina (AT) que flanqueia o DNA.

Outra possibilidade, já discutida anteriormente, é uma provável resistência endógena da planta ao antibiótico (HAUPTMANN *et al.*, 1988; NEHRA *et al.*, 1994). Neste caso, o gene realmente não teria se integrado ao genoma.

5. CONCLUSÕES

Os resultados e observações apresentados neste trabalho, em função das condições em que foi conduzido, permitem as seguintes conclusões:

É possível obter calos embriogênicos do clone SP80-180 em quantidade e qualidade satisfatórias para transformação genética por bombardeamento, em cerca de 70-80 dias. Para o clone SP82-3721, há necessidade de otimização do protocolo.

Os melhores resultados de expressão GUS foram encontrados quando se utilizou 14 cm de distância do alvo, 9 kgf/cm² de pressão de disparo e 1,0 µg de DNA plasmidial por disparo, em acelerador de micropartículas desenvolvido pelo Centro de Tecnologia Copersucar, segundo modelo descrito por FINER *et al.* (1992).

Plantas transformadas para o gene *neo* (marcador que confere resistência a antibióticos como a kanamicina e geneticina) e para o gene *bar* (que confere resistência ao herbicida glufosinato de amônio) foram obtidas do clone SP80-180, mas não do clone SP82-3721, provavelmente pela baixa qualidade e quantidade dos calos produzidos por este clone, sendo necessários maiores esforços na obtenção de explante.

O gene *neo*, dirigido pelo promotor da ubiquitina do milho (*ubi-1*), foi considerado um eficiente marcador, sendo utilizado em co-transformação. E a geneticina mostrou-se um eficiente agente seletivo, quando adicionado em meio de cultura, na concentração de 30 mg/L, durante todo o processo de regeneração de plantas, embora a presença de escapes não esteja descartada.

As análises moleculares confirmaram as análises fenotípicas em todas as plantas transformadas analisadas, com exceção de uma, que se mostrou transformada para o gene *bar* e não para o gene *neo*, nos testes moleculares.

É possível produzir plantas transformadas do clone SP80-180, em estágio de casa de vegetação e nas condições aqui descritas, em cerca de 200 dias, sendo 80 dias para obtenção de calos, 80 dias no processo seletivo e 40 no enraizamento e climatização.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL - 1996, Rio de Janeiro, **56**: 8-32, 1996.

ARENCIBIA, A.; MOLINA, P. GUTIÉRREZ, C.; FUENTES, A.; GREENIDGE, V.; MENÉNDEZ, E.; DE LA RIVA, G. & SELMAN-HOUSSEIN. Regeneration of transgenic sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plant from intact meristematic tissue transformed by eletroporation. **Biotecnologia Aplicada**, **9(2)**: 156-165. 1992.

ARENCIBIA, A.; MOLINA, P.R.; DE LA RIVA, G. & SELMAN-HOUSEIN, G. Production of transgenic sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by intact cell eletroporation. **Plant Cell Reports**, **14**: 305-309. 1995.

BARCELO, P.; HAGEL, C.; BECKER, D.; MARTIN, A. & LÖRZ, H. Transgenic cereal (tritordeum) plants obtained at high efficiency by microprojectile bombardment of inflorescence tissue. **The Plant Journal**, **5(4)**: 583-592. 1994.

- BATTRAW, M. & HALL, T.C. Expression of a chimeric neomycin phosphotransferase II gene in first and second generation transgenic rice plants. **Plant Science**, **86**: 191-202. 1992.
- BIRCH, R.G. New gene technologies and their potential value for sugarcane. **Outlook on Agriculture**, **25(4)**: 219-226. 1996.
- BIRCH, R.G. & FRANKS, T. Development and otimization of microprojectile systems for plant genetic transformation. **Australian Journal of Plant Physiology**, **18**: 453-469. 1991.
- BIRCH, R.G.; BOWER, R.; ELLIOTT, A.; POTIER, B.; FRANKS, T. & CORDEIRO, G. Expression of foreign genes in sugarcane. In: Proceedings of the XXII Congress of the International Society of Sugarcane Technologists. 1995. COCK, J.H. & BREKELBAUM, T. (eds.). Tecnicaña, Cali, Colombia, vol.2, pp. 369-373. 1995.
- BOWER, R. & BIRCH, R.G. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. **The Plant Journal**, **2**: 409-416. 1992.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, **72**: 248-254. 1976.
- BRESSIANI, J.A.; MACHADO JUNIOR, G.R. & MENDONÇA, J.R. Estratégias de melhoramento para aumento do teor de sacarose em cana-de-açúcar. In: SEMINÁRIO DE TECNOLOGIA AGRONÔMICA - COPERSUCAR, 7. Piracicaba, 1997. *Anais*. Piracicaba, Centro de Tecnologia Copersucar, 1997. p. 1-8.

- BROWN, D.C.W.; TIAN, L.; BUCKLEY, D.J.; LEFEBVRE, M.; MCGRANTH, A. & WEBB, J. Development of a simple particle bombardment device for gene transfer into plant cells. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **37**: 47-53, 1994.
- CASAGRANDE, M.V.; SANGUINO, A. & FEREZINI, E. Evolução, prejuízos e métodos de controle de quatro importantes doenças de cana-de-açúcar. In: SEMINÁRIO DE TECNOLOGIA AGRONÔMICA - COPERSUCAR, 7. Piracicaba, 1997. *Anais*. Piracicaba, Centro de Tecnologia Copersucar, 1997. p. 183-191.
- 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 chimaeric gene. **Plant Cell Reports**, **6**: 297-301. 1987.
- CHOWDHURY, M.K.U. & VASIL, I.K. Stably transformed herbicide resistant callus of sugarcane via microprojectile bombardment of cell suspension cultures and electroporation of protoplasts. **Plant Cell Reports**, **11**: 494-498. 1992.
- 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**, **5**: 213-218. 1996.
- CHRISTOU, P.; FORD, T.L.; & KOFRON, M. Production os transgenic rice (*Oriza sativa* L.) plants from agronomically important Indica and Japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. **Bio/Technology**, **9**: 957-962. 1991.

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

D'HALLUIN, K., BONNE, E., BOSSUT, M., DE BEUCKELEER, M. & LEEMANS, J. Transgenic maize plants by tissue eletroporation. **The Plant Cell**, **4**: 1495-1505. 1992.

FALCO, M.C.; TULMANN NETO, A.; MENDES, B.M.J. & ZAPATA , F.J. Isolation and cultivation of sugarcane protoplasts. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, **8(3)**: 175-179. 1996a.

FALCO, M.C.; MENDES, B.M.J.; TULMANN NETO, A. & GLÓRIA, B.A. Histological characterization of *in vitro* regeneration of *Saccharum sp.* **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, **8(2)**: 93-97. 1996b.

FERNANDES, A.C. Produção e produtividade da cana-de-açúcar no Brasil. In: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE DE TÉCNICOS AÇUCAREIROS E ALCOOLEIROS DO BRASIL - STAB, 6. Maceió, 1996. *Anais*. Maceió, STAB, 1996. p. 602-612.

FINER, J.J. & MCMULLEN, M.D. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via bombardment. **Plant Cell Reports**, **8**: 586-589. 1990.

FINER, J.J.; VAIN, P.; JONES, M.W. & MCMULLEN, D. Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. **Plant Cell Reports**, **11**: 323-328. 1992.

- FRANKS, T. & BIRCH, R.G. Gene transfer into intact sugarcane cells using microprojectile bombardment. **Australian Journal of Plant Physiology**, **18**: 471-480, 1991.
- 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**, **12**: 666-670. 1993.
- GAMBLEY, R.L.; FORD, R. & SMITH, G.R. Microprojectile transformation of sugarcane meristems and regeneration of shoots expressing β -glucuronidase. **Plant Cell Reports**, **12**: 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**, **21**: 603-612. 1994.
- HAUPTMANN, R.M.; VASIL, V.; OZAIAS-AIKINS, P.; TABAEIZADEH, Z., ROGERS, S.G.; FRALEY, R.T.; HORSCH, R.B. VASIL, I.K. Evaluation of selectable markers for obtaining stable transformants in the Gramineae. **Plant Physiology**, **86**: 602-606. 1988.
- HÉBERT, D.; KIKKERT, J.R.; SMITH, F.D. & REISCH, B.I. Optimization of biolistic transformation of embryogenic grape cell suspensions. **Plant Cell Reports**, **12**: 585-589. 1993.

HUNOLD, R.; BRONNER, R. & HAHNE, G. Early events in microprojectile bombardment: cell viability and particle location. **The Plant Journal**, **5(4)**: 593-604. 1994.

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

JOSEPH JÚNIOR, H. Pro-Álcool: Atrás de um futuro. **Sincopeças**, **303**: 54. 1997

KLEIN, T.M.; GRADZIEL, T.; FROMM, M.E. & SANFORD, J.C. Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high-velocity microprojectiles. **Bio/Technology**, **6**: 559-563. 1988.

LIU, M.C. Sugarcane. In: SHARP, W.R.; EVANS, D.A.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (eds.) **Handbook of plant cell culture crop species**. New York, Macmillan Publishing, 1984. v.2, cap.20, p. 572-605.

MATZKE M.A. & MATZKE, A.J.M. How and why do plants inactivate homologous (trans)genes? **Plant Physiology**, **107**: 679-685. 1995.

MATZKE, M.A.; PRIMIG, M.; TRNOVSKY, J. & MATZKE A.J.M. Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants. **EMBO J.**, **8(3)**: 643-649. 1989.

MCCOUCH, S.R., KOCHERT, G., YU, Z.H., WANG, Z.Y., KUSH, G.S., COFFMAN, W.R. AND TANKSLEY, S.D. Molecular mapping of rice chromosomes. **Theoretical and Applied Genetic**, **76**: 815-829. 1988.

MITSUI. Japan Sugar, Starch and Ethanol Yearbook, 1995. Mitsui & Co. Ltd. 65pp, 1995.

MOORE, P.H. Progress in sugarcane molecular biology. In: COCK, J.H. & BREKELBAUM, T. (eds). Proceedings of the International Society of Sugarcane Technologists XXII Congress, Cartagena, vol.2. Tecnicaña, Cali, Colombia, pp. 353-362. 1996.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, **15**: 473-479. 1962.

NEHRA, N.D.; CHIBBAR, R.N.; LEUNG, N.; CASWELL, K.; MALLARD, C.; STEINHAUER, L.; BAGA, M. & KARTHA, K.K. Self-fertile transgenic wheat plants regenerated from isolated scutellar tissues following microprojectile bombardment with two distinct gene constructs. **The Plant Journal**, **5(2)**: 285-297. 1994.

O QUE fazer com o Proálcool? **Sincopeças**, São Paulo, 303: 22-25, jul. 1997.

PENG, J.; KONONOWICZ, H. & HODGES, T.K. Transgenic indica rice plants. **Theoretical and Applied Genetics**, **83**: 855-863. 1992.

PONCE, J.P. Cultivo de tejidos en caña de azúcar. In: ROCA, W.M. & MROGINSKI, L.A. (eds.) Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Las Villas, CIAT, 1984. cap.25, p. 543-575.

RATHUS, C. & BIRCH, R.G. Stable transformation of callus from eletroporated sugarcane protoplasts. **Plant Science**, **82**: 81-89. 1992.

REGISTER III, J.C. Approaches to evaluating the transgenic status of transformed plants. **Tibtech**, **15**: 141-146. 1997.

RICCI JUNIOR, A. Planejamento para controle de invasoras em lavouras de cana-de-açúcar, através de software processador de imagens - IDRISI®. In: SEMINÁRIO DE TECNOLOGIA AGRONÔMICA - COPERSUCAR, 7. Piracicaba, 1997. *Anais*. Piracicaba, Centro de Tecnologia Copersucar, 1997. p. 392-394.

RITALA, A.; MANNONEN, L.; ASPEGREN, K.; SALMENKALLIO-MARTTILA, M.; KURTÉN, U.; HANNUS, R.; LOZANO, J.M.; TEERI, T.H. & KAUPPINEN, V. Stable transformation of barley tissue culture by particle bombardment. **Plant Cell Reports**, **12**: 435-440. 1993.

RUSSEL, J.A.; ROY, M.K. & SANFORD, J.C. Physical trauma and tungsten toxicity reduce the efficiency of biolistic transformation. **Plant Physiology**, **98**: 1050-1056. 1992.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. Molecular Cloning - A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

SANFORD, J.C. The biolistic process. **Tibtech**, **6**: 299-302. 1988.

SANFORD, J.C.; KLEIN, T.M.; WOLF, E.D. & ALLEN, N. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. **J. Particle Sci. Technol**, **5**: 27-37. 1987.

- SANFORD, J.C.; SMITH, F.D. & RUSSEL, A. Optimizing the biolistic process for different biological applications. **Methods in Enzimology**, San Diego, **217**: 483-509. 1993.
- 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.**, **125**: 15-23. 1992.
- STAM, M.; MOL, J.N.M. & KOOTER, J.M. The silence of genes in transgenic plants. **Annals of Botany**, **79**: 3-12. 1997.
- STATISTICS ANALYSIS SYSTEM / SAS INSTITUTE INC. **SAS USER'S GUIDE: STATISTICS**. 5 ed. Carv, SAS Institute Inc., 1985. 956p.
- SUN, S.S.M.; MARETZKI, A.; NAGAI, C.; HOUTCHENS, K. & BIDNEY, D. Transformation of *Saccharum spontaneum* by particle bombardment. **Sugarcane**, **5**: 1-7, 1993.
- TAYLOR, P.W.J.; KO, H.; 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**, **28**: 69-78. 1992.
- TOKI, S.; TAKAMATSU, S.; NOJIRI, C.; Ooba, S.; ANZAI, H.; IWATA, M.; CHRISTENSEN, A.H.; QUAIL, P.H. & UCHIMIYA, H. Expression of a maize ubiquitin gene promoter-*bar* chimeric gene in transgenic rice plants. **Plant Physiology**, **100(3)**: 1503-1507. 1992.

VAIN, P.; MCMULLEN, M.D. & FINER, J.J. Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. **Plant Cell Reports**, **12**: 84-88. 1993.

WOLFSON, J.L. & MURDOCK, L.L. Potential use of protease inhibitors for host plant resistance: a test case. **Environmental Entomology**, **24**(1): 52-57. 1995.

YAMASHITA, T.; IIDA, A. & MORIKAWA, H. Evidence that more than 90% of β -glucuronidase expressing cell after particle bombardment directly receive the foreign gene in their nucleus. **Plant Physiology**, **97**: 829-831. 1991.

ZHANG, S.; CHEN, L.; QU, R.; MARMEY, P.; BEACHY, R. & FAUQUET, C. Regeneration of fertile transgenic Indica (group 1) rice plants following microprojectile transformation of embryogenic suspension culture cells. **Plant Cell Reports**, **15**: 465-469. 1996.

ZHOU, H.; ARROWSMITH, J.W.; FROMM, M.E.; HIRONAKA, C.M.; TAYLOR, M.L.; RODRIGUEZ, D.; PAJEAU, M.E.; BROWN, S.M.; SANTINO, C.G. & FRY, J.E. Glyphosate-tolerant CP4 and GOX genes as a selectable marker in wheat transformation. **Plant Cell Reports**, **15**: 159-163. 1995.