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

**Modificação genética de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) visando à produção
de ácidos graxos conjugados**

João Fernando Bortoleto

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de
Plantas

**Piracicaba
2010**

João Fernando Bortoleto
Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas

Modificação genética de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) visando à produção de ácidos graxos conjugados

Orientador:
Prof. Dr. **ANTONIO VARGAS DE OLIVEIRA
FIGUEIRA**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2010

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

Bortoleto, João Fernando

Modificação genética de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) visando à produção de ácidos graxos conjugados / João Fernando Bortoleto. - - Piracicaba, 2010.
143 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

1. Ácido linoleico 2. Ácidos graxos 3. Biolística 4. Biotecnologia de plantas 5. Cana-de-açúcar 6. Engenharia genética 7. Isômeros 8. Plantas transgênicas I. Título

CDD 633.61
B739m

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

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por estar sempre junto comigo, iluminando meus caminhos;

A minha família: meus pais João Bortoleto Filho e Maria Terezinha Guidi Bortoleto, que acima de tudo são exemplos de vida, tendo sido fundamentais para eu ter chegado até aqui, e ao meu irmão Lucas Bortoleto;

Ao Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira pela orientação, pela oportunidade de realização das atividades práticas no Laboratório de Melhoramento de Plantas e por seu papel na minha formação como cientista;

Aos professores e funcionários do Departamento de Genética, ESALQ, USP. Sou muito grato à secretária Cândida Vanderléia de Oliveira do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pela prontidão de atendimento e empenho na resolução de questões burocráticas;

À Profa. Dra. Siu Tsai do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, CENA, USP;

Ao Prof. Dr. Carlos Priminho Pirovani do Laboratório de Proteômica, UESC;

Ao Prof. Dr. Augusto Tulmann Neto do Laboratório de Melhoramento de Plantas, CENA, USP;

À Profa. Dra. Helaine Carrer e a Danila Melotto-Passarim e Frederico de Jesus do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular de Plantas, ESALQ, USP;

Ao Prof. Dr. Luiz Vieira e à Nathalia Belintani do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, IAPAR;

À Profa. Dra. Beatriz Mendes e à Alessandra Monteiro-Hara, Fabiana Muniz e Liliane Stipp do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, CENA, USP;

Ao Prof. Dr. Ricardo de Azevedo e à Daiana Schmidt e Salette Gaziola do Laboratório de Genética Bioquímica, ESALQ, USP;

Ao Prof. Dante Lanna e a Maria Etchegaray do Laboratório de Nutrição e Crescimento Animal, ESALQ, USP;

Aos técnicos do Laboratório de Melhoramento de Plantas, CENA: Benedita Inês Rodrigues, José Alves Luís Eduardo Fonseca, Myrian Raquel Orsi, Paulo Cassieri Neto e Wlamir Godoy, pelo imenso auxílio prestado durante minhas atividades em laboratório;

Aos colegas que do Laboratório de Melhoramento de Plantas, CENA, USP, por todo o aprendizado: Aline Possignolo, André Tagliaferro, Aline Harissis, Angela Artero, Celso Litholdo Junior, Danielle Scotton, Eduardo Bressan, Francisco Cláudio Lopes, Gabriela Silva, Gabriel Gruberger, Gildemberg Leal Jr, Isabela de Camargo, João Felipe Nebó de Oliveira, Ilse Ferrari, Janaína Albino, Jeanne Machado, Juliana Deganello, Laís Rocha, Laura Possignolo, Layanne Souza, Mariele Pazotto, Marielle Vitti, Onildo de Jesus, Paula Yamamoto, Rafael Peixoto Júnior, Raul Almeida, Renato Ferreira, Tais Tomazini, Tercilio Calsa Junior e Verusca Rossi. Em especial, a Deborah Nishimura, Felipe Campana, Ligia dos Santos, Maria Lorena Sereno e Thaísa Tessutti pela grande amizade e a Mariana Belotti também pelo imprescindível auxílio prestado no desenvolvimento do trabalho;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por concessões de bolsas;

E, por fim, deixo o meu obrigado a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Cana-de-açúcar.....	17
2.2 Biotecnologia vegetal.....	19
2.3 Biotecnologia da cana-de-açúcar.....	22
2.4 Novas aplicações biotecnológicas da cana-de-açúcar.....	27
2.5 Ácido linoleico conjugado.....	30
2.6 Isomerase do ácido linoleico.....	35
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1 Material biológico.....	39
3.2 Extração de DNA genômico de <i>Propionibacterium acnes</i>	39
3.3 Análise e quantificação de DNA.....	40
3.4 PCR para clonagem gênica.....	40
3.5 Clonagem gênica.....	42
3.5.1 Ligação de inserto a vetor.....	43
3.5.2 Transformação de células eletrocompetentes de <i>Escherichia coli</i>	43
3.5.3 Armazenamento de clones.....	43
3.5.4 Minipreparação de DNA plasmidial.....	44
3.5.5 Confirmação de clonagem por PCR, restrição enzimática e sequenciamento de DNA..	44
3.6 Construção de vetor para expressão em <i>Escherichia coli</i>	45
3.6.1 Transformação de células quimiocompetentes de <i>Escherichia coli</i>	47
3.6.2 Indução de expressão em <i>Escherichia coli</i>	47
3.6.3 Lise celular por choque térmico.....	48
3.6.4 SDS-PAGE.....	48
3.6.5 Eletroeluição e diálise.....	49
3.6.6 Quantificação de proteína.....	49

3.6.7 Sequenciamento de proteína.....	49
3.6.8 Extração, metilação e análise de ácidos graxos em <i>Escherichia coli</i>	50
3.7 Construções para transformação de cana-de-açúcar.....	51
3.7.1 pAHC27.....	51
3.7.2 pAPAI.....	51
3.7.3 pARPAI.....	52
3.7.4 pHA9.....	53
3.8 Transformação genética de cana-de-açúcar.....	53
3.8.1 Cultivo <i>in vitro</i> de cana-de-açúcar.....	53
3.8.2 Preparo do alvo.....	54
3.8.3 Biolística.....	54
3.8.4 Ensaio histoquímico de atividade da enzima β -glucuronidase.....	56
3.8.5 Seleção, regeneração e aclimatização.....	57
3.8.6 Extração de DNA total.....	57
3.8.7 PCR para detecção de transgenes.....	58
3.8.8 <i>Southern blot</i>	58
3.8.9 Extração de RNA total.....	60
3.8.10 Análise e quantificação de RNA.....	61
3.8.11 Síntese de cDNA.....	62
3.8.12 RT-PCR.....	62
3.8.13 RT-qPCR.....	63
3.8.14 <i>Western blot</i>	63
3.8.15 Extração, metilação e análise de ácidos graxos de cana-de-açúcar.....	65
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
4.1 Clonagem do gene da isomerase do ácido linoleico de <i>Propionibacterium acnes</i>	67
4.2 Construção de vetor para expressão heteróloga em <i>Escherichia coli</i>	68
4.3 Expressão heteróloga da proteína PAI em <i>Escherichia coli</i>	69
4.4 Avaliação do perfil de ácidos graxos em <i>Escherichia coli</i> transformada.....	71
4.5 Construção de vetores para transformação genética de cana-de-açúcar.....	73
4.5.1 pAPAI.....	73
4.5.2 pARPAI.....	76

4.5.3 pHA9.....	79
4.6 Cultivo <i>in vitro</i> e transformação genética de cana-de-açúcar.....	79
4.6.1 Análise da presença de transgenes por PCR e <i>Southern blot</i>	86
4.6.2 Análise de transcritos por RT-PCR e RT-qPCR.....	95
4.6.3 Análise de proteína por <i>Western blot</i>	105
4.6.4 Análise de ácidos graxos por Cromatografia Gasosa.....	108
5 CONCLUSÕES.....	111
REFERÊNCIAS.....	113
APÊNDICE.....	139

RESUMO

Modificação genética de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) visando à produção de ácidos graxos conjugados

Plantas transgênicas constituem interessantes alternativas para a produção de compostos com elevado valor agregado como polímeros industriais, proteínas farmacológicas e lipídios nutracêuticos. Como candidata à biofábrica, a cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) apresenta características agronômicas favoráveis, além de versatilidade de matéria-prima, que é empregada em fins tradicionais, como produção de álcool e açúcar, e até mesmo para geração de energia ou como forragem para alimentação de gado. Em nutrição animal, uma molécula bastante estudada é o ácido linoleico conjugado (CLA), que tem atividades anticarcinogênica, antidiabética, antiaterosclerose e moduladora do sistema imune e metabolismo de lipídios. O isômero *t10,c12*-CLA tem sido particularmente promissor na agropecuária por conta de inibição da síntese de gordura do leite e na melhoria do desempenho reprodutivo de vacas. Com o objetivo de avaliar a cana-de-açúcar como sistema biotecnológico para produção de CLA, o gene da isomerase do ácido linoleico de *Propionibacterium acnes* (*pai*) foi isolado e clonado, previamente caracterizado em *Escherichia coli* e, em seguida, utilizado na biolística de calos embriogênicos para regeneração de plantas transgênicas. No sistema procariótico, foi induzida a expressão de *pai* e a proteína heteróloga foi verificada como uma banda de 50 kDa, porém não houve alteração evidente do perfil de ácidos graxos da bactéria. Na cotransformação de cana-de-açúcar, o vetor pHA9, que contém o gene de seleção da neomicina fosfotransferase (*nptII*), foi bombardeado com uma das duas construções desenvolvidas com o promotor da poliubiquitina 1 de milho (pUbi1) dirigindo a expressão de *pai* adicionado ou não de sequência sinal da proteína de reparo de DNA recA para direcionamento para cloroplasto. Das cultivares ‘CTC2’ e ‘IACSP9303046’, foram obtidas eficiências de transformações de 2,2% e 1,7-7,1%, respectivamente. Um total de 156 plântulas foram regeneradas após regime de seleção com geneticina. Em seguida, 115 plântulas transgênicas foram identificadas por PCR para *nptII* e, entre essas, 29 e 48 foram PCR-positivas para *pai* e *rec-pai*, respectivamente. De 50 plantas aclimatizadas, 12 foram analisadas por *Southern blot* para *nptII* e 4 para *pai*, confirmando-se a transformação genética. Para comprovar a expressão de mRNA de *pai*, 27 plantas foram averiguadas por RT-PCR e RT-qPCR e indicaram produção de transcritos estudados. A análise de expressão das proteínas de folha por *Western blot* em 21 plantas selecionadas não produziu resultados conclusivos quanto à detecção de PAI. Essas mesmas foram analisadas por Cromatografia Gasosa, mas não foi detectado acúmulo de CLA. Embora seja possível a introdução e expressão do gene *pai* em cana-de-açúcar, é necessário avaliar em maior detalhe os fatores que possam afetar positivamente a produção de CLA, como tipo de tecido, compartimentos subcelulares para direcionamento proteico ou coexpressão de fosfolipases.

Palavras-chave: Ácido linoleico conjugado; Biolística; Isomerase do ácido linoleico;

Transformação genética

ABSTRACT

Genetic modification of sugarcane (*Saccharum* spp.) aiming the production of conjugated fatty acids

Transgenic plants are attractive alternatives for the production of high value compounds as industrial polymers, pharmacological proteins and nutraceutical lipids. As a candidate for biofactory, sugarcane presents favorable agronomic characteristics and versatility of raw material which is used for traditional purposes such as ethanol and sugar production and even for power generation or as forage feeding of cattle. In animal nutrition, a widely studied molecule is the conjugated linoleic acid (CLA), which has anticarcinogenic, antidiabetic, antiatherosclerosis and immune system and metabolism of lipids modulator activities. The isomer *t*10,*c*12-CLA has been particularly promising in agriculture because of inhibition of milk fat synthesis and improvement of the reproductive performance of cows. Aiming to evaluate the sugarcane as a system for biotechnological production of CLA, the linoleic acid isomerase gene from *Propionibacterium acnes* (*pai*) was isolated and cloned, previously characterized in *Escherichia coli* and then used for biolistic of embryogenic calli for regenerating transgenic plants. In the prokaryotic system, the expression of *pai* was induced and the heterologous protein was verified as a band of 50 kDa, but there was no obvious change in fatty acid profile of the bacterium. In cotransformation of sugarcane, pH9 vector containing the selection gene neomycin phosphotransferase (*nptII*) was bombarded with one of the two constructions developed with the promoter of maize polyubiquitin 1 (pUbi1) driving the expression of *pai*, either added or not with the signal sequence of DNA repair protein recA for targeting to chloroplast. Cultivars ‘CTC2’ and ‘IACSP93-3046’ were obtained with transformation efficiencies of 2.2% and 1.7 a 7.1%, respectively. A total of 156 plantlets were regenerated after selection with geneticin regimen. After that, 115 transgenic plantlets were identified by PCR for *nptII* and among then, 29 and 48 were PCR-positive for *pai* and *rec-pai*, respectively. Of 50 acclimatized plants, 12 were analyzed by Southern blot for *nptII* and 4 for *pai*, confirming the genetic transformation. In order to prove the expression of *pai* mRNA, 27 plants were verified by RT-PCR and RT-qPCR and indicated the production of the studied transcripts. Expression analysis of leaf proteins by Western blot in 21 plants selected produced no conclusive results regarding the detection of PAI. Those were analyzed by gas chromatography and no accumulation of CLA was detected. Although it was possible to introduce and express the *pai* gene in sugarcane, it is necessary to evaluate in more detail the factors that may positively affect the production of CLA, as tissue type, subcellular compartments for protein targeting or coexpression of phospholipases.

Keywords: Conjugated linoleic acid; Biolistics; Linoleic acid isomerase; Genetic transformation

1 INTRODUÇÃO

O impacto da transformação genética no melhoramento vegetal é hoje nitidamente perceptível pela crescente área ocupada por plantas transgênicas em diferentes países (JAMES, 2008). Com a superação das barreiras reprodutivas pelo uso desta tecnologia, torna-se possível a manipulação de genes nativos ou mesmo a introdução de sequências de DNA que não existem no *pool* gênico de dada espécie vegetal, criando-se novos genótipos em curto espaço de tempo. Além de estudos básicos de genômica funcional e desenvolvimento de plantas melhoradas para finalidades agrícolas usuais como resistência a microrganismos, pragas e herbicidas, mais recentemente muitos dos sistemas de modificação genética de plantas têm sido direcionados para a produção de compostos com elevado valor agregado como polímeros de uso industrial, proteínas farmacológicas e lipídios com propriedades nutracêuticas (NAPIER, 2007; MA et al., 2005; van BEILEN; POIRIER, 2008). Segurança, praticidade e baixo custo são vantagens oferecidas pelas plantas em relação aos sistemas tradicionais dependentes de microrganismos, cultura de células de animais ou mesmo animais transgênicos (MA; DRAKE; CHRISTOU, 2003).

Em tese, existem diversas opções de plantas que podem ser escolhidas como plataformas biológicas para produção de compostos recombinantes. A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) exemplifica uma excelente planta candidata para emprego como biofábrica. Com sistema de transformação genética relativamente bem estabelecido (BOWER; BIRCH, 1992) e disponibilidade de informações genômicas (CHRISTENSEN; QUAIL, 1996; VETTORE et al., 2003), esta planta ainda possui importantes características como crescimento rápido, acúmulo elevado de biomassa, colmo bem desenvolvido, propagação vegetativa em escala comercial, e florescimento restrito, o que minimiza o risco de dispersão de transgenes. Do ponto de vista socioeconômico, a cultura da cana-de-açúcar passa por um momento bastante favorável, não apenas pelo interesse na produção em larga escala de açúcar e álcool, mas pela versatilidade matéria-prima, que também é empregada na geração de energia e utilizada como forragem na pecuária (LANDELL et al., 2002; MATSUOKA; FERRO; ARRUDA, 2009).

Embora grande parte dos trabalhos produzidos com transformação genética de híbridos de *Saccharum* spp. tenha visado à resistência a herbicidas, doenças e pragas (LAKSHMAN et al., 2005), hoje o uso desta planta como plataforma para geração de produtos alternativos ocupa

posição de destaque. Nos últimos anos, alguns compostos, tais como a proteína farmacológica fator estimulante de colônia de macrófagos granulócitos humanos (GM-CSF) (WANG et al., 2005), os polímeros industriais ácido *p*-hidroxibenzoico (pHBA) (McQUALTER et al. 2005) e poli-hidroxibutirato (PHB) (PETRASOVITS et al., 2007) e açúcares como sorbitol, isomaltulose e trealulose (CHONG et al., 2007; WU; BIRCH, 2007; HAMERLI; BIRCH; 2010) foram produzidos em cana-de-açúcar, consolidando-a como biofábrica e oferecendo novas perspectivas para que a indústria canavieira se torne mais sustentável e competitiva no futuro.

Uma molécula bastante estudada em pesquisas em nutrição animal nas duas últimas décadas é o ácido linoleico conjugado (CLA). Com a descoberta de sua atividade anticarcinogênica (PARIZA; HARGRAVES, 1985), o interesse pelo CLA conduziu à identificação de diversos outros efeitos benéficos decorrentes deste em dietas, como por exemplo, a melhoria da resposta imune e redução de seus efeitos catabólicos (COOK et al., 1993; MILLER et al., 1994), diminuição da severidade da aterosclerose (LEE; KRITCHEVSKI; PARIZA, 1994), aumento de crescimento (CHIN et al., 1994; BEE, 2000) e redução do acúmulo de gordura (PARK et al., 1997; WEST et al., 1998; DUGAN et al., 1999; OSTROWSKA et al., 1999; PARK et al., 1999; WEST et al., 2000), restauração da sensibilidade à insulina (BELURY; MAHON; BANNI, 2003), entre outros (PARIZA; PARK; COOK, 2001; PARK; PARIZA, 2007).

A diversidade de respostas fisiológicas reportadas se justifica, pelo menos em parte, pelo fato de que o CLA compreende isômeros geométricos e posicionais do ácido linoleico com dupla ligação conjugada, sendo *c9,t11*-CLA e *t10,c12*-CLA os melhores conhecidos (STEINHART, 1996). Ambos podem ter influência sobre composição corporal de animais no sentido de aumento do peso magro e diminuição da gordura subcutânea (DUGAN et al., 1997; DUNSHEA; O'QUINN et al., 2000; EGGERT et al., 2001; DEMAREE et al., 2002; WIEGAND et al., 2002). Especificamente o isômero *t10,c12*-CLA mostrou-se forte inibidor da síntese de gordura do leite de vacas (BAUMGARD et al., 2000) e foi associado com a melhoria do desempenho reprodutivo quando incluído na dieta durante o início da lactação desses animais (DE VETH et al., 2009).

Na natureza, o CLA comumente é produzido por microrganismos pela ação de enzimas chamadas isomerases de ácidos graxos poli-insaturados, tendo sido alguns genes correspondentes já identificados. (LIAVONCHANKA; FEUSSNER, 2008). Com isso, plantas transgênicas de tabaco e arroz modificadas em laboratório com o gene de uma dessas enzimas, a isomerase do

ácido linoleico de *Propionibacterium acnes*, passaram a acumular o isômero *t10,c12*-CLA (HORNUNG et al., 2005; KOHNO-MURASE et al., 2006).

Considerando-se a importância econômica da cana-de-açúcar no Brasil e seu potencial de uso como forrageira, o presente trabalho buscou aliar o progresso da biotecnologia vegetal junto ao crescente interesse no uso de ácidos graxos poli-insaturados em nutrição animal. Para isso, plantas transgênicas de cana-de-açúcar para superexpressão de gene da isomerase do ácido linoleico foram geradas e avaliadas como plataformas para produção de CLA. O desenvolvimento de plantas de cana-de-açúcar capazes de produzir CLA seria de grande interesse, em especial na agropecuária, por conta dos efeitos promissores destas moléculas na qualidade do leite e na reprodução de vacas leiteiras.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) pertence à família Poaceae, sendo caracterizada como uma gramínea perene, de grande porte, que se propaga principalmente pela forma vegetativa. O gênero *Saccharum* possui centro de origem e diversidade prováveis na Nova Guiné e populações selvagens e híbridos interespecíficos ocorrendo desde o Japão até o Mediterrâneo (DANIELS; ROACH, 1987). Cultivada nas regiões tropical e intertropical, acumula altos níveis de sacarose e, por este motivo, representa uma das culturas socioeconomicamente mais importantes.

No Brasil, o colmo da cana-de-açúcar é fonte de matéria-prima para produção de açúcar e álcool. Desde os anos 1970, a indústria canavieira tem recebido incentivos governamentais concentrados no estado de São Paulo, que atualmente responde por 87% de toda a produção nacional. O setor movimenta capital equivalente a quase 2% do PIB e gera 4,5 milhões de empregos diretos e indiretos segundo dados da safra 2008/2009 (JORNAL DA CANA, 2010). O sucesso da economia sucroalcooleira deve-se, em parte, pela busca de sustentabilidade energética em um cenário mundial onde questões ambientais assumem posição relevante. Estima-se que o etanol produzido da cana-de-açúcar em apenas 1% das terras agriculturáveis seja suficiente para substituir metade da demanda de gasolina (DESPLECHIN, 2009) e que o processamento do bagaço que sobra na indústria possa suprir 15% da necessidade de energia elétrica de nosso país (MATSUOKA; FERRO; ARRUDA, 2009).

Além do tradicional papel como fonte de matéria-prima para o setor sucroalcooleiro, a cana-de-açúcar tem se destacado como alimento em sistemas de produção de bovinos. Entre os pecuaristas é o volumoso preferencial, pois apresenta vantagens como facilidade de cultivo, disponibilidade em épocas de escassez de forragens nas pastagens e, sobretudo, grande produção de matéria seca (BOIN; MATTOS; D'ARCE, 1987; MOREIRA et al., 1987). O melhoramento genético da cana-de-açúcar, no entanto, tem sido quase que exclusivamente direcionado ao atendimento das necessidades industriais, sendo pouco dedicado a fins de alimentação animal. Assim, as cultivares empregadas como forragem equivalem àquelas mesmas utilizadas pelas usinas, pois oferecem produtividade e teor de açúcar superiores. Uma exceção é a cultivar 'IAC86-2480', que mostra parâmetros nutricionais superiores (LANDELL et al., 2002).

Especificamente quando se destina à alimentação animal, é importante considerar não apenas o elevado teor de açúcar de uma cultivar, mas priorizar baixa concentração e boa digestibilidade de fibras. Relação fibra em detergente neutro (FDN), teor de açúcar, digestibilidade *in vitro* de matéria seca, entre outros fatores, são empregados em estudos sobre divergência nutricional entre cultivares de cana-de-açúcar (PATE, 1981; CARVALHO et al., 1993; ANDRADE et al., 2003; AZEVÊDO et al., 2003; FREITAS et al., 2006). Para melhorar a digestibilidade, geralmente são adicionados compostos nitrogenados ao alimento volumoso. Além do aumento do teor proteico da cana-de-açúcar, essa prática promove alterações na parede celular (BÜRGI, 1985; SCHMIDT et al., 2007). Quando se utiliza bagaço de cana-de-açúcar, é comum o emprego de auto-hidrólise, que se associada a agentes químicos como hidróxido de sódio, pode trazer resultados ainda mais satisfatórios para a melhoria da digestibilidade (MANZANO; PENATI; NUSSIO, 2004).

Do ponto de vista genético, as cultivares modernas de cana-de-açúcar são híbridos altamente poliploides e aneuploides ($2n = 100-130$) derivados do cruzamento entre o genitor selvagem *S. spontaneum* ($2n = 48-128$) com o nobre *S. officinarum* ($2n = 80$), seguido de retrocruzamentos com este último (D'HONT et al., 1998). Devido a diferenças estruturais, numéricas e recombinacionais entre cromossomos dessas duas espécies, a cana-de-açúcar talvez exemplifique um dos genomas mais complexos em meio às plantas cultivadas (GRIVET; ARRUDA, 2002).

Pela necessidade de estudos mais detalhados na área de genética, grandes investimentos foram voltados para a criação do Projeto Genoma da cana-de-açúcar ou *Sugarcane EST Project* (SUCEST), gerando, no começo dessa década, uma importante base de dados a respeito de sequências gênicas desta planta. Pesquisadores computaram mais de 260.000 sequências expressas (ESTs, *expressed sequence tags*) a partir de bibliotecas de cDNA de diversos tecidos e órgãos em vários estágios de desenvolvimento (VETTORE et al., 2003). Como consequência, genes relacionados ao acúmulo de açúcar e à resposta a diferentes tipos de estresse puderam ser identificados (NOGUEIRA et al., 2003; ROSSI et al., 2003; NOGUEIRA et al., 2005; CALSA JÚNIOR; FIGUEIRA, 2007; BORGES; CAGLIARI; RAMOS, 2007; ROCHA et al., 2007).

Mais recentemente, muitas das pesquisas sobre cana-de-açúcar têm sido financiadas pelo novo Programa de Bioenergia (BIOEN, 2009) da Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP), que procura integrar trabalhos com plantas utilizadas para fornecimento de

biocombustível. Investigações, principalmente nos campos de biomassa, processamento a síntese de biocombustíveis e impactos gerados, podem assegurar ao nosso país uma posição entre os líderes na área bioenergética e põem a cana-de-açúcar em patamar estratégico.

Em vista do grande interesse pela cultura da cana-de-açúcar, as informações geradas por considerável número de pesquisas concluídas ou em andamento no panorama da biologia molecular oferecem promissoras ferramentas para o melhoramento. Uma vez que esforços direcionados ao melhoramento genético tradicional de *Saccharum* invariavelmente esbarram na complexidade de seu genoma, a biotecnologia aparece como uma interessante alternativa e tem sido então empregada em diferentes linhas de estudo em genética.

2.2 Biotecnologia vegetal

A manipulação do genoma de plantas com base na tecnologia do DNA recombinante tem conduzido a profundo impacto na pesquisa em nível genômico e celular. Genes nativos podem ser avaliados quanto à funcionalidade por superexpressão, repressão ou expressão controlada – por exemplo, pela ação de indutores, reguladores de desenvolvimento ou mesmo por especificidade de tecidos – em vários modelos de plantas. Por essa técnica, também é possível introduzir sequências nucleotídicas não existentes no *pool* gênico de uma espécie, superando assim barreiras genéticas, e gerar cultivares melhoradas em um menor tempo.

Plantas transgênicas que, em geral, superexpressam proteínas heterólogas, têm ganhado cada vez maior destaque. Desde a primeira liberação em 1996, essas culturas biotecnológicas conquistaram espaço, aceitação e conduziram ao aumento de produtividade e ao crescimento econômico de países desenvolvidos ou em desenvolvimento. Soja, milho, algodão e canola transgênicos são hoje cultivados em larga escala e constituem parte relevante do comércio internacional e da agricultura (JAMES, 2008).

Os primeiros relatos de plantas geneticamente modificadas, no entanto, datam somente do início da década de 80 (DE BLOCK et al., 1984; HORSCH et al., 1984; PASZKOWSKI et al., 1984), ainda que os princípios da moderna biotecnologia vegetal já fossem conhecidos há tempos. Os conceitos de totipotência – habilidade de uma única célula se dividir e produzir uma planta inteira, derivado da Teoria Celular de Schleiden e Schwann de 1838/1839 – e de transformação genética – alteração genética causada pela captura, integração e expressão de genes exógenos, relatada por Griffith em bactérias em 1928 – fundaram a base biotecnológica.

Como consequência desses trabalhos pioneiros, a comunidade científica pôde avançar no estabelecimento de soluções nutrientes para cultivo *in vitro* de células e tecidos de plantas, na pesquisa de reguladores vegetais, na obtenção de embriões somáticos e no estabelecimento de tecnologias de transferência de genes para o interior celular (VASIL, 2008).

Para a maioria das espécies vegetais, o sistema de introdução de genes utilizado é baseado na capacidade natural da bactéria gram-negativa de solo *Agrobacterium tumefaciens* em causar o tumor ou a galha de coroa (CHILTON et al., 1977), que levou à produção das primeiras plantas transgênicas em 1983 (POTRYKUS, 1991; VASIL, 2008). A transformação genética mediada por *Agrobacterium* se tornou subsequentemente um procedimento de rotina, pelo menos para as espécies de dicotiledôneas, em muitos laboratórios (HOOYKAAS; SCHILPEROORT, 1992; ZUPAN; ZAMBRYSKI, 1995). Representa um método indireto de transformação, porque envolve a transferência de um segmento de DNA (DNA de transferência ou T-DNA), que é parte de um plasmídeo indutor de tumor (plasmídeo Ti), da agrobactéria para o núcleo das células da planta (SHENG; CITOVSKY, 1996).

Ferimentos na planta permitem a entrada da bactéria e fornecem compostos fenólicos que ativam a maquinaria de transferência do T-DNA de *A. tumefaciens*. O T-DNA é delimitado por repetições imperfeitas de 25 pb, que definem as bordas esquerda e direita, e é transferido de maneira polar para o núcleo da célula vegetal com auxílio de proteínas codificadas por cerca de 35 genes *vir*, onde se integra ao seu genoma (HELLENS; MULLINEAUX; KLEE, 2000). Em condições naturais, o tumor desenvolve-se como resultado de divisões celulares estimuladas pela ação de genes da biossíntese de auxinas e citocininas localizados no T-DNA das cepas selvagens. Sequências adicionais do DNA transferido ainda codificam enzimas relacionadas com produção e excreção de opinas para o consumo específico da bactéria patogênica (HOOYKAAS; SCHILPEROORT, 1992; HOOYKAAS; BEIJERSBERGEN, 1994).

Se a região *vir* funciona em um *replicon* fora do T-DNA, a remoção dos genes flanqueados pelas duas bordas não impede a habilidade da agrobactéria em transferir seu T-DNA (GELVIN, 2003). Em laboratório, essas linhagens são manipuladas e “desarmadas” para perder a oncogenicidade e, portanto, a capacidade de causar o sintoma típico de doença. Uma vez que o T-DNA e a região *vir* podem estar contidos em plasmídeos separados, vetores Ti artificiais – os vetores binários – puderam ser criados (HOEKEMA et al., 1983; HELLENS; MULLINEAUX; KLEE, 2000; LEE; GELVIN, 2008). Nesse sistema, as funções dos genes *vir* são providas pelo

plasmídeo Ti desarmado residente na linhagem de agrobactéria, enquanto o T-DNA, que contém o gene de interesse a ser transferido, é parte de um vetor binário. Como a maioria das técnicas de clonagem gênica requerem o uso de *Escherichia coli*, o vetor binário inclui origem de replicação adicional para essa bactéria.

Para as espécies de monocotiledôneas, a transformação genética evoluiu mais lentamente. Os sistemas utilizados inicialmente eram métodos diretos, isto é, com transferência de DNA por meios físico-químicos, representados pela eletroporação ou pelo choque osmótico com polietilenoglicol (PEG) de protoplastos (VASIL, 2008). A situação de ausência de parede celular permitiria que o DNA fosse transferido para o interior da célula tratada por conta da perturbação temporária da membrana plasmática. Embora essa tenha sido a atenção inicial no início da década de 80, a transformação genética de protoplastos mostrou inúmeros entraves como dificuldade de regeneração de plantas, anormalidades fenotípicas e esterilidade, provavelmente decorrentes do longo tempo de cultivo de células *in vitro* (BIRCH, 1997; HIEI et al., 1997). Tornou-se ainda menos atrativa quando constatado que as monocotiledôneas, inclusive os cereais, poderiam ser transformadas pelo cocultivo de culturas embriogênicas com certas cepas supervirulentas de *Agrobacterium* na presença de acetosiringona, um potente indutor dos genes de *vir* (HIEI; KOMARI, KUBO, 1994). O conceito de que alguns genes de virulência tinham efeito de dose (JIN et al., 1987) permitiu a construção de vetores chamados de superbinários, que carregavam genes de virulência adicionais (KOMARI et al., 1996).

Apesar das perspectivas e vantagens da transformação mediada por *Agrobacterium*, como na geração de plantas com pequeno número de cópias e maior estabilidade do transgene (KOMARI et al., 1998; DAI et al., 2001; SHRAWAT; LÖRZ, 2006), foi um método direto – o bombardeamento de partículas ou biolística –, que revolucionou o campo de transformação das monocotiledôneas, principalmente no que concerne à família Poaceae, onde estão alocadas as culturas de maior relevância econômica (CHRISTOU, 1992).

Buscando o desenvolvimento de métodos universais aplicados à transformação de plantas, Sanford mostrou que, de fato, era possível transferir materiais exógenos, inclusive DNA, para o interior de células vivas de cebola por meio de um revólver de genes incipiente em trabalhos pioneiros desenvolvidos na Universidade de Cornell, Estados Unidos (SANFORD et al., 1987). A análise preliminar de diversos materiais como partículas para penetrar na parede de células indicou que substâncias de elevada densidade, a exemplo de tungstênio e ouro eram mais

adequadas. Para propósitos não médicos, as partículas de tungstênio do tipo M10 mostraram-se mais práticas e, desde então, têm sido adotadas como padrão em trabalhos com plantas. Métodos de precipitação de ácidos nucleicos sobre as partículas foram desenvolvidos e outra preocupação foi a otimização dos parâmetros físicos do processo de bombardeamento, incluindo velocidade, pressão de vácuo, distância de disparo e pré-condicionamento do alvo, entre outros, até ter sido provada definitivamente a transformação estável de uma planta pelo método biolístico (KLEIN et., 1988).

De prova de conceito (KLEIN et al., 1987), a tecnologia passou logo a constituir um sistema funcional de transferência gênica. Em pouco tempo, o protótipo inicial que utilizava pólvora seca para gerar uma onda de energia tornou-se obsoleto e foi substituído por um sistema robusto, passando a empregar descarga elétrica e gás hélio sob alta pressão. Nesse aparato, uma membrana macrocarreadora plástica e microcarreadores – representados geralmente por partículas de tungstênio revestidas com DNA depositado sobre ela – eram acelerados em alta velocidade em direção ao tecido ou células-alvo. Comparado ao dispositivo de pólvora, o modelo modificado é mais limpo e seguro, permite melhor controle de energização, distribui micropartículas mais uniformemente sobre as células-alvo, tem maior consistência bombardeamento a bombardeamento, é menos impactante ao alvo e produz de 4-300 vezes mais transformantes nas espécies testadas (SANFORD et al., 1991).

Com o trabalho consolidado, a ideia de Sanford foi patenteada e o equipamento foi passado a ser comercializado como *Biolistic* PDS-1000. Depois disso, diversos laboratórios adquiriram esse modelo ou então desenvolveram equipamentos próprios baseados no aparato de hélio, sendo hoje o procedimento de biolística amplamente executado em todo o mundo. O bombardeador passou a ser, conseqüentemente, usado para diversos fins como para transferência de projéteis biológicos como bactérias (RASMUSSEN et al., 1994), partículas virais (KIKKERT et al., 1999) e vacinação genética (TANG; DeVIT; JOHNSTON, 1992). Na área de biologia de plantas em especial, causou grande impacto, sendo a grande maioria dos campos de culturas transgênicas da atualidade oriundos da aplicação da técnica biolística (SANFORD, 2000).

2.3 Biotecnologia da cana-de-açúcar

Genoma complexo, base genética estreita, baixa fertilidade e longo ciclo de melhoramento e de seleção clonal (12-15 anos) traduzem-se em empecilhos ao melhoramento convencional dos

híbridos interespecíficos de *Saccharum* spp. Por outro lado, com isso a cana-de-açúcar torna-se excelente candidata ao melhoramento molecular, o que conduziu o desenvolvimento de pesquisas em diferentes áreas da biotecnologia, especialmente no que se refere a técnicas de cultura de tecidos e introdução de novos genes em cultivares comerciais (LAKSHMANAN et al., 2005).

Desde os primeiros relatos de regeneração *in vitro* de plantas de cana-de-açúcar a partir de calos (HEINZ; MEE, 1969; BARBA; NICKELL, 1969), a cultura de tecidos emergiu como valiosa ferramenta de pesquisa para melhoramento e controle de doenças. Somente mais tarde, entretanto, o desenvolvimento de um sistema de embriogênese somática expressivo facilitou o avanço da biotecnologia. A habilidade de induzir a embriogênese somática em protoplastos, suspensões celulares e culturas de calos formaram a base para a exploração efetiva das tecnologias de transgenia. Um dos trabalhos mais importantes de cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar refere-se ao estabelecimento de um sistema reprodutível para indução de calos a partir segmentos de folhas imaturas (HO; VASIL, 1983). Detalhes de requerimentos nutricionais para iniciação de calos e diferenciação de embriões somáticos, ontogenia deles e regeneração de plântulas foram avaliados. Os autores descreveram três tipos de calos com potencial morfogênico diferenciado: embriogênico, duro, compacto e com aspecto liso, que se torna branco nos estágios tardios do desenvolvimento; mole, friável, semitranslúcido e que ocasionalmente desenvolve raízes; e mucilaginoso, brilhante, não morfogênico. Taylor et al. (1992), por outro lado, reconhecem quatro tipos de calo em cana-de-açúcar, sendo classificados de acordo com os autores como tipo 1: semitranslúcido e não morfogênico; tipo 2: macio, mucilaginoso, amarelo-acinzentado e não morfogênico; tipo 3: compacto, duro, amarelo com estruturas globulares com superfície lisa que se tornam brancas nos estágios tardios do desenvolvimento e embriogênico; e tipo 4: amarelo, friável e organogênico. Outros relatos evidenciam apenas dois tipos de calos: um nodular, compacto, branco e embriogênico e outro mais friável, translúcido e que forma raízes (FALCO et al., 1996; FALCO; TULMANN NETO; ULIAN, 2000). De acordo esses e outros trabalhos, a região proximal à base foliar constituiu a fonte de explantes preferida para indução dos calos embriogênicos em meio de cultura com regulador de crescimento ácido 2,4-diclorofenoxiacético, que representa uma potente auxina (LAKSHMANAN, 2006). Inflorescências podem, contudo, ser alternativamente empregadas no processo de obtenção de calos (SNYMAN et al., 2006).

Em paralelo ao estabelecimento de protocolos de cultivo *in vitro*, foram desenvolvidos protocolos eficientes para adaptação dos métodos de transformação genética disponíveis. Diante disso, na última década, foram utilizadas pela primeira vez diferentes técnicas como eletroporação (RATHUS; BIRCH, 1992), tratamento com PEG (CHEN et al., 1987), biolística (FRANKS; BIRCH, 1991) e transformação mediada por *Agrobacterium* (ARENCIBIA et al., 1998; ELLIOTT et al., 1998) para introduzir genes marcadores em células ou calos de *Saccharum* spp.

Das tecnologias iniciais de transformação, o tratamento com polietilenoglicol permitiu a obtenção das primeiras células transgênicas de cana-de-açúcar (CHEN et al., 1987). Apesar de constituir um método simples, não recebeu muita importância por conta de baixa eficiência e reprodutibilidade. Chen et al., (1987) relataram uma eficiência de transformação de um em 10^6 protoplastos tratados. Mais eficiente e reprodutível que o método polietilenoglicol, mostrou-se a transformação por eletroporação quando aplicada à cana-de-açúcar. De diferentes cultivares foram obtidos calos transformados de forma estável (CHOWDHURY; VASIL, 1992; RATHUS; BIRCH, 1992). Rathus e Birch (1992) documentaram um evento de transformação em 10^2 - 10^4 protoplastos eletroporados. A dificuldade de regeneração a partir de protoplastos, porém, não permitiu que plantas transformadas fossem produzidas. Plantas transgênicas foram obtidas por essa técnica e estudadas somente mais tarde quando utilizados tecidos meristemáticos de plantas cultivadas *in vitro* (ARENCIBIA et al., 1992) ou células embriogênicas intactas (ARENCIBIA et al., 1995; ARENCIBIA et al., 1997; ARENCIBIA et al., 1999).

A transformação mediada por *Agrobacterium* foi aplicada com sucesso em cana-de-açúcar apenas no final da década de 90, mas até hoje encontra limitações, tendo em vista que poucos trabalhos confirmam o sucesso dessa técnica em *Saccharum* spp. (LAKSHMANAN et al., 2005). Plantas transgênicas morfológicamente normais foram recuperadas por Arencibia et al. (1998) em frequência de transformação entre $9,4 \times 10^{-3}$ e $1,15 \times 10^{-2}$ quando calos foram cocultivados com LBA4404 (pTOK233) e EHA101 (pMTC3IG), carregando um vetor supervirulento ou constituindo propriamente uma cepa supervirulenta, respectivamente. No mesmo ano, Enríquez-Obregón et al. (1998) geraram plantas transgênicas resistentes ao herbicida BASTA com frequência de transformação de 10-35% a partir de seções meristemáticas inoculadas com a cepa C58C1 Rif^R (At 2260) dentro de quatro tratamentos diferenciados quanto à composição dos meios de cultura. Experimentos posteriores adotaram seleção visual com base no sistema da

proteína verde fluorescente (GFP) para identificação de linhagens de calos transformados (ELLIOTT et al., 1998; ELLIOTT et al., 1999). Buscando-se reduzir problemas de variação somaclonal, Manickvasagam et al. (2004) utilizaram metodologia de regeneração direta a partir de gemas axilares e produziram plantas de cana-de-açúcar transgênicas resistentes a herbicida em cinco meses com a maior eficiência de transformação já relatada para cultura, chegando a 50%. Carmona et al. (2005) posteriormente também obtiveram plantas transgênicas resistentes a herbicida transformadas via *Agrobacterium*. O gene *gna* (aglutinina de *Galanthus nivalis*) foi introduzido em cana-de-açúcar por Zhangsun et al. (2007), que desenvolveram plantas resistentes a afídeos. Recentemente, calos de cana-de-açúcar foram transformados com o gene *cry1Ab* para geração de plantas resistentes à broca *Chilo infuscatellus* (ARVINTH et al., 2010). A fim de desenvolver um método reprodutível para transformação da cultivar australiana ‘Q117’, Joyce et al. (2010) avaliaram as cepas AGL0, AGL1, EHA105 e LBA4404, contendo um novo vetor superbinário, e identificaram as maiores variáveis que afetam a transferência do T-DNA e a regeneração de plântulas transformadas.

Quando se trata de transformação de cana-de-açúcar, entretanto, a biolística é ainda a técnica mais amplamente explorada (BIRCH, 1997). Na Austrália, investigações pioneiras sobre transferência de genes mediada por microprojéteis a calos e suspensões celulares de cana-de-açúcar foram conduzidas por Franks e Birch (1991). No ano seguinte, teriam sido reportadas as primeiras plantas transgênicas de cana-de-açúcar (BOWER; BIRCH, 1992). Subsequentemente, inúmeras cultivares foram transformadas em diferentes laboratórios, inclusive no Brasil (GAMBLEY; FORD, SMITH, 1993; BOWER et al., 1996; SNYMAN et al., 1996; IRVINE; MIRKOV, 1997; JOYCE et al., 1998; FALCO; TULMANN NETO; ULIAN, 2000, entre outros).

Em geral, a engenharia genética tem rotineiramente introduzido caracteres de importância agrônômica em cultivares comerciais, resultando em diversos estudos com cana-de-açúcar transgênica em países como África do Sul, Austrália, Brasil, Cuba, Estados Unidos e Índia. Grupos de pesquisa do exterior têm utilizado tradicionalmente a biolística para criar e avaliar plantas transgênicas com resistência a patógenos microbianos (JOYCE et al., 1998; INGELBRECHT; IRVINE; MIRKOV, 1999; ZHANG; XU; BIRCH, 1999; BUTTERFIELD et al., 2002; McQUALTER et al., 2004; GILBERT et al., 2005; JAIN et al., 2007; GILBERT et al., 2009), a pragas (ARENCIBIA et al., 1999; SÉTAMOU et al., 2002; NUTT, 2005; WENG et al., 2006; CHRISTY et al., 2009; ARVINTH et al., 2010) e a herbicidas (GALLO-MEAGHER;

IRVINE, 1996; ENRÍQUEZ-OBREGÓN et al., 1998; LEIBBRANDT; SNYMAN, 2003; MANICKAVASAGAM et al., 2004; SNYMAN et al., 2006).

Há também pesquisas em engenharia genética do metabolismo de açúcares com suspensões celulares ou plantas maduras de cana-de-açúcar, inclusive com uso de sequências antissenso para inibição das enzimas invertase ácida (MA et al., 2000), polifenol oxidase (VICKERS et al., 2005a; VICKERS et al., 2005b), invertase neutra (ROSSOUW et al., 2007) e pirofosfato: frutose 6-fosfato 1-fosfotransferase (GROENEWALD; BOTHA, 2008), com *hairpin* visando à redução da atividade da ADP-glicose pirofosforilase (AGPase) e com superexpressão da β -amilase plastidial (FERREIRA et al., 2008). A tecnologia RNA de interferência (RNAi) de dupla fita foi aplicada com sucesso por Osabe et al. (2009) para o silenciamento do gene da fitoeno dessaturase (*pds*) em plantas maduras de cana-de-açúcar, ampliando perspectivas sobre seu potencial na regulação de sequências endógenas mesmo em um organismo com elevada poliploidia e heterozigosidade no genoma.

No Brasil, os trabalhos publicados até então empregaram quase que exclusivamente o método de biolística. Por essa técnica, a transformação de uma cultivar brasileira de cana-de-açúcar foi realizada pela primeira vez por Falco, Tulmann Neto e Ulian (2000), que produziram plantas resistentes ao herbicida glufosinato de amônio por conta de expressão do gene *bar*. No campo de resistência a insetos, plantas transformadas foram capazes de retardar o crescimento da broca-da-cana *Diatraea saccharalis* quando expressos genes codificadores de inibidores de proteinase do tipo inibidor de tripsina Kunitz (SKTI) e inibidor Bowman-Birk (SBBI) derivados de soja (FALCO; SILVA-FILHO, 2003). Saciloto (2003) objetivou o estabelecimento de plantas transformadas com o gene *pr5k* do receptor de proteína quinase PR5K para resistência ao fungo da ferrugem *Puccinia melanocephala*, porém as análises moleculares por PCR não forneceram resultados consistentes acerca do sucesso da transgenia neste trabalho. Para estudar a inibição de florescimento, Figueiredo (2003) obteve plantas de cana-de-açúcar com construção contendo o cDNA de *leafy* em antissenso. O bombardeamento de partículas cobertas com DNA também permitiu o acúmulo de prolina em plantas transgênicas para o gene da Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintase (*p5cs*), as quais apresentaram melhor resposta oxidativa em condições de estresse hídrico (MOLINARI et al., 2007). Ribeiro et al. (2008) superexpressaram o gene de uma canacistatina, que constitui um inibidor de cisteíno proteinase (CPI), estratégia utilizada contra ataque de pragas em plantas transformadas. No genoma de *Saccharum* spp., o cDNA do gene que codifica a

proteína AtBI-1 (*Bax inhibitor-1* de *Arabidopsis thaliana*), supressora do mecanismo de morte celular programada, foi introduzido para superexpressão em plantas transgênicas por biolística e também mediante *Agrobacterium* (MELOTTO-PASSARIN, 2009). Para silenciamento via shRNA (*short hairpin* RNA) dos genes das aquaporinas *SspTIP1;1* e *SspPIP1;4*, Jesus (2010) transformou linhagens de plantas de cana-de-açúcar. Em trabalho mais recente, o gene *comt(AS)* (*ácido cafeico-O-mentiltransferase*) em antissenso foi utilizado na transformação genética com o intuito de se produzir plantas com menor teor de lignina, que poderiam ser úteis para a indústria e agropecuária (BARBOSA, 2010).

Em vista das inúmeras publicações brevemente comentadas, não é difícil perceber quão grande é o interesse em transgenia de cana-de-açúcar no Brasil. Diante disso, investimentos para o desenvolvimento dessa tecnologia vão além das universidades e aplicam-se na criação de companhias biotecnológicas e centros de pesquisa. No Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), Piracicaba, SP, experimentações em campo avaliam genes para tolerância a herbicida, resistência a vírus, resistência a insetos, inibição de florescimento e aumento da produção de sacarose. Cana-de-açúcar tolerante a herbicida também é atualmente testada em experimentações de campo conduzidas pela BASF, São Paulo, SP. Desde 2002, as companhias Alellyx e Canavialis, Campinas, SP, incorporadas recentemente pela Monsanto, juntam esforços para desenvolver novas cultivares de cana-de-açúcar e hoje possuem linhagens para resistência à seca. Segundo consulta ao acervo da Comissão Nacional de Biossegurança (CNTBio), há 38 experimentos em campo aprovados. Com isso, espera-se que a primeira cultivar comercial de cana-de-açúcar transgênica passe a ser uma realidade dentro de poucos anos (MATSUOKA; FERRO; ARRUDA, 2009).

2.4 Novas aplicações biotecnológicas da cana-de-açúcar

Assim como para a maioria das culturas geneticamente modificadas, a primeira geração de plantas de cana-de-açúcar foi engenheirada com genes para resistência a herbicidas, doenças e pragas (LAKSHMANAN et al., 2005). Hoje a biotecnologia permeia além da agricultura e impacta a indústria e o setor de energia na busca de produtos alternativos de alto valor agregado, de modo a tornar a indústria canavieira mais competitiva e sustentável (BRUMBLEY et al., 2007).

Sistemas de expressão gênica baseados em plantas sofreram significativos avanços na produção em larga escala não apenas produtos de interesse industrial, mas de proteínas e lipídios com propriedades farmacêuticas ou nutraceuticas (MA et al., 2005; NAPIER, 2007; van BEILEN; POIRIER, 2008). Segurança, praticidade e baixo custo são vantagens oferecidas pelo emprego de plantas como fábricas biológicas em relação aos sistemas tradicionais dependentes de microrganismos, cultura de células de animais ou mesmo animais transgênicos (MA; DRAKE; CHRISTOU, 2003).

Há diversas razões pelas quais a cana-de-açúcar se faz uma biofábrica ideal. Além de sistema de transformação genética relativamente bem estabelecido (BOWER et al., 1996) e disponibilidade de informações genômicas (CHRISTENSEN; QUAIL, 1996; VETTORE et al., 2003), a cultura possui vantagens intrínsecas. É amplamente cultivada, tem crescimento rápido e acumula elevada biomassa, sendo que o aparato fotossintético do tipo C4 produz açúcar com bastante eficiência. O sistema de armazenamento, o colmo, é bem desenvolvido e de fácil colheita e a indústria possui infraestrutura suficiente para transporte da biomassa para processamento nas usinas. Embora possa florescer, é propagada vegetativamente em escala comercial, o que minimiza o risco de dispersão de transgenes. No Brasil, a inexistência de espécies nativas compatíveis sexualmente com a cana-de-açúcar favorece a liberação de plantas transgênicas.

Para a produção de componentes de interesse industrial como o polímero de cristal líquido (LCP), o principal monômero utilizado é o ácido *p*-hidroxibenzoico (pHBA). McQualter et al. (2005) produziram plantas de cana-de-açúcar capazes de acumular pHBA pela expressão de genes codificadores de duas proteínas bacterianas: uma versão direcionada a cloroplasto da corismato piruvato-liase de *E. coli* (*cpl*) ou a 4-hidroxicinamoil-CoA hidratase/liase de *Pseudomonas fluorescens* (*hchl*). Para produzir o peptídeo de trânsito para cloroplasto, para a primeira construção, parte do gene *rbcS* de milho, que codifica para a subunidade menor da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (rubisco) foi posicionada acima do gene *cpl*. A enzima HCHL foi a que mostrou catálise mais efetiva nas linhagens de plantas transgênicas produzidas, que acumularam níveis de até 7,3% e 1,5% do peso seco, respectivamente nas folhas e nos colmos. Em mesma linha de trabalho, o plástico biodegradável poli-hidroxibutirato (PHB), naturalmente metabolizado por várias bactérias como fonte de carbono, foi sintetizado em cana-de-açúcar (PETRASOVITS et al., 2007). Os genes codificadores das enzimas β -cetotiolase

(*phaA*), acetoacetil-redutase (*phaB*) e PHB sintase (*phaC*) de *Ralstonia eutropha*, foram fusionados *in tandem* dentro de três tipos de construções para avaliação da localização dos produtos em compartimentos subcelulares distintos. As enzimas da biossíntese do polímero foram expressas no citosol, nas mitocôndrias pelo direcionamento com sequência da subunidade- β da ATPase de *Nicotiana plumbaginifolia* ou nos plastídios por fusão traducional com sequência da subunidade menor da rubisco de *Pisum sativum*. Nas linhagens citosólicas o acúmulo foi mínimo, nas mitocondriais não detectado, mas nas plastidiais ocorreu com valor de até 1,88% do peso seco das folhas, sem causar efeitos deletérios evidentes. Semelhantemente ao caso do trabalho com pHBA, o acúmulo de PHB nos colmos foi substancialmente inferior e avaliações de sua distribuição espaço-temporal foram conduzidas em estudo posterior (PURNELL et al., 2007).

O acoplamento da síntese de produtos alternativos a intermediários do metabolismo de sacarose constitui uma estratégia interessante quando aplicada em cana-de-açúcar. Foi particularmente útil para produção de sorbitol, molécula empregada como adoçante não calórico, na síntese de ácido ascórbico e em produtos de higiene pessoal (CHONG et al., 2007). O acúmulo médio de sorbitol na linhagem mais produtiva de plantas transformadas com o gene da sorbitol 6-fosfato desidrogenase de *Malus domestica* (*mds6phd*) foi de 120 mg/g do peso seco (equivalente a 60% dos açúcares solúveis) na lâmina foliar e de 10 mg/g no colmo. Para tentar contornar as penalidades fenotípicas detectadas, o gene da glicoquinase de *Zymomonas mobilis* (*zmgk*) foi coexpresso nas linhagens transgênicas a fim de repor a glicose 6-fosfato consumida pela S6PDH, porém não foi suficiente para solucionar os danos provocados. De qualquer forma, foi comprovado pela primeira vez que níveis impressionantes de produtos alternativos poderiam ser gerados de intermediários do metabolismo de sacarose. Wu e Birch (2007) usaram uma versão do gene da sacarose isomerase de *Pantoea dispersa* UQ68J (*si*), que é capaz de converter sacarose em um açúcar que não é metabolizado pela planta, a isomaltulose. Na atualidade, o mercado de isomaltulose apresenta excelentes perspectivas, pois esse açúcar tem qualidade superior à sacarose: é digerido lentamente por humanos e causa uma menor flutuação na glicose no sangue e nas concentrações de insulina, além de ser não cariogênico e não higroscópico. Para elaborar a construção gênica utilizada na transgenia, a sequência líder periplásmica bacteriana de *si* foi removida e substituída por uma sequência líder de retículo endoplasmático adicionada de parte da sequência do pró-peptídeo N-terminal (*ntpp*) da esporamina de batata doce para direcionamento vacuolar. Sem haver decréscimo na concentração de sacarose armazenada, as plantas que

expressaram a enzima sacarose isomerase acumularam isomaltulose e produziram o dobro de conteúdo de açúcar total. Seguindo essa tendência, Hamerli e Birch (2010) engenheiraram plantas transgênicas que além de isomaltulose, produziram trealulose pela expressão de uma trealulose sintase (*mutB*) modificada pela omissão da sequência referente ao peptídeo líder periplásmico no gene de *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45 e pela introdução de sequência de direcionamento a vacúolo como anteriormente. A elevada solubilidade da trealulose representa vantagem para a produção de geleias e para propósitos industriais que necessitam de soluções de açúcar altamente concentradas. Nas plantas transgênicas, a concentração de trealulose aumentou com a maturação dos internós, atingindo valores de até 600 mM, com quase completa conversão da sacarose na maioria dos internós maduros. As plantas permaneceram vigorosas e a produção de trealulose nas linhagens selecionadas foi mantida em múltiplas gerações em casa de vegetação e condições de campo.

Com o intuito de buscar alternativas para a produção de compostos de interesse médico, como aqueles que normalmente são sintetizados em *E. coli* recombinante, purificados e utilizados no tratamento de doenças, Wang et al. (2005) empregaram a cana-de-açúcar para síntese de fator estimulante de colônia de macrófagos granulócitos humanos (GM-CSF). O acúmulo dessa glicoproteína, que é usada no tratamento de anemias, foi avaliado em linhagens transformadas com construções contendo peptídeo sinal inibidor de proteinase II de batata (SP) para direcionamento para via secretória adicionadas ou não de sinal de retenção de retículo endoplasmático (HDEL). Variou de indetectável a 0,02% das proteínas solúveis nas plantas transgênicas, sendo este último valor detectado nas linhagens com HDEL. Apesar de pequenas quantidades detectadas, no entanto, foi suficiente para estimular a proliferação de células de medula óssea em ensaio onde extrato vegetal foi adicionado ao meio de cultura, colocando a cana-de-açúcar como planta promissora para produção de fármacos.

2.5 Ácido linoleico conjugado

Alimentos funcionais contêm substâncias que oferecem benefícios além daqueles esperados por seus tradicionais valores nutricionais (MILNER, 1999). Muitas delas são de origem vegetal, porém os animais também são capazes de sintetizar tais moléculas, denominadas bioativas ou nutraceuticas. O ácido linoleico conjugado (CLA) pertence a essa classe e é

encontrado principalmente em produtos oriundos de ruminantes, como leite, carne e derivados (CHIN et al., 1992).

A descoberta de atividade anticarcinogênica do CLA (PARIZA; HARGRAVES, 1985) não somente despertou o interesse para o discernimento dos mecanismos bioquímicos de ação destas moléculas em pesquisas na área de saúde, mas também correlatas, levando a um crescente número de publicações nas duas últimas décadas (PARIZA, 2010). Em modelos animais, benefícios adicionais foram identificados como melhoria da resposta imune e redução de seus efeitos catabólicos (COOK et al., 1993; MILLER et al., 1994), diminuição da severidade da aterosclerose (LEE; KRITCHEVSKI; PARIZA, 1994), aumento de crescimento (CHIN et al., 1994; BEE, 2000) e redução do acúmulo de gordura (PARK et al., 1997; WEST et al., 1998; DUGAN et al., 1999; OSTROWSKA et al., 1999; PARK et al., 1999; WEST et al., 2000), restauração da sensibilidade à insulina (BELURY; MAHON; BANNI, 2003), entre outros (PARIZA; PARK; COOK, 2001; PARK; PARIZA, 2007).

Os diversos efeitos fisiológicos se justificam, pelo menos em parte, pelo fato de que o CLA não é único. Compreende, na verdade, isômeros geométricos e posicionais do ácido linoleico (ácido octadecadienoico) com presença de dupla ligação conjugada (Figura 1). Teoricamente, o número de isômeros existentes depende da dupla ligação conjugada, que pode ocorrer em diferentes posições ao longo da molécula, bem como estar configurada como *cis,trans*, *trans,cis*, *cis,cis* ou *trans,trans*. No entanto, são os isômeros 18:2^{Δ⁹Z,11^E} (*c9,t11*-CLA) e 18:2^{Δ¹⁰E,12^Z} (*t10,c12*-CLA) que predominam em diferentes proporções nas misturas de CLA produzidas quimicamente para experimentação científica. Outros isômeros menos abundantes como 18:2^{Δ⁹E,11^E} (*t9,t11*-CLA) e 18:2^{Δ¹⁰E,12^E} (*t10,t12*-CLA) são comuns em algumas preparações, que ainda podem conter moléculas adicionais com dupla ligação conjugada nas posições 8,10 ou 11,13 (PARIZA; PARK; COOK, 2001).

Segundo Bauman et al. (1999), o CLA encontrado em alimentos de origem animal é derivado do processo de bio-hidrogenação efetuada por microrganismos ruminais. Os lipídios disponíveis nas forragens ingeridas por ruminantes consistem, em sua maioria, de glicolipídios e fosfolipídios, sendo que os principais ácidos graxos são os ácidos graxos insaturados linoleico (18:2^{Δ⁹Z,12^Z}; *c9,c12*-LA) e linolênico (18:3^{Δ⁹Z,12^Z,15^Z}; *c9,c12,c15*-ALA), enquanto sementes oleaginosas contêm predominantemente triacilgliceróis com ácido oleico (*c9*-AO; 18:1^{Δ⁹Z}) e linoleico. Inicialmente, são as lipases microbianas que catalisam a hidrólise de ligações éster e

disponibilizam os ácidos graxos do alimento para a bio-hidrogenação; o CLA é derivado de LA e ALA livres. A sequência de bio-hidrogenação de *c9,c12*-LA inicia-se no rúmen com a isomerização da dupla ligação, resultando na formação de *c9,t11*-CLA, que se torna disponível para absorção ou ainda pode sofrer uma segunda reação, quando é reduzido em ácido vacênico (*t11*-VA; 18:1 ^{Δ^{11E}}). O passo final é uma nova redução com formação de um ácido graxo saturado, o ácido esteárico (SA; 18:0) a partir de *t11*-VA. De maneira semelhante, na bio-hidrogenação de ALA, ocorre isomerização seguida por uma sequência de reduções, o que acarreta também na formação de SA. As duas primeiras reações são rápidas, enquanto a terceira é lenta, culminando no acúmulo de *t11*-VA e, conseqüentemente, disponibilizando parte dele para absorção ruminal.

Em determinados tecidos animais, *c9,t11*-CLA é sintetizado por ação enzima Δ^9 -dessaturase, também conhecida por estearoil CoA dessaturase (SCD), a partir de *t11*-VA absorvido, como nos adipócitos de animais em crescimento e nas glândulas mamárias de ruminantes lactantes (BAUMAN et al., 1999; PARIZA; PARK; COOK, 2001). A síntese endógena de *c9,t11*-CLA por essa via é a fonte primária de CLA na gordura do leite de vacas (GRINARI et al., 2000). Esse é, portanto, o isômero mais abundante em produtos de origem animal, atingindo quantidades superiores a 80% de todo o CLA nessas fontes (CHIN et al., 1994). O outro isômero principal do CLA, *t10,c12*-CLA, aparece em quantidades negligenciáveis nos alimentos e usualmente é produzido por procedimentos da indústria química (SÆBØ, 2003).

É possível que vários isômeros tenham atividade biológica, porém os efeitos fisiológicos melhor conhecidos foram induzidos com dois isômeros: *c9,t11*-CLA e *t10,c12*-CLA (Figura 1). Em alguns casos, o resultado é produzido por um dos isômeros agindo exclusivamente. Por exemplo, *t10,c12*-CLA é responsável pela queda na síntese de gordura (PARK et al., 1999), enquanto *c9,t11*-CLA promove melhoria no crescimento de roedores jovens (PARIZA; PARK; COOK, 2001). Em outros casos, ambos agem juntos para produzir um efeito: *c9,t11*-CLA e *t10,c12*-CLA parecem ser igualmente efetivos na inibição da carcinogênese mamária induzida em roedores (IP et al., 2002), em parte pela atenuação da angiogênese (MASSO-WELCH et al., 2002). *t10,c12*-CLA se mostra mais efetivo que *c9,t11*-CLA na inibição de determinadas células cancerosas MCF-7 por via relacionada com p53 (KEMP; JEFFY; ROMAGNOLO, 2003). Ainda, em outros casos, os isômeros ativos parecem atuar em oposição (ROCHE et al., 2002; SONG et al., 2004).

Figura 1 – Estruturas do *t*10,*c*12-CLA (acima), *c*9,*t*11-CLA (centro) e *c*9,*c*12-LA (abaixo) (STEINHART, 1996)

Atualmente, há evidências de que o isômero *t*10,*c*12-CLA estaria relacionado à mudança da composição corporal por meio de um mecanismo de redução da abundância de mRNA de proteínas centrais na via bioquímica de síntese de lipídios. *t*10,*c*12-CLA regula negativamente a atividade das enzimas lipoproteína lipase (LPL) (PARK et al., 1997; PARK et al., 1999) e SCD (LEE; PARIZA; NTAMBI, 1998; PARK et al., 2000). Age também sob os níveis dos fatores transcricionais, receptor γ ativador-proliferador de peroxissomos (PPAR γ) e proteína α de ligação a *enhancer*/CCAAT, modulando a diferenciação de pré-adipócitos em desfavorecimento ao ganho de gordura corporal (KANG et al., 2003). Na maioria dos modelos, as reduções substanciais na gordura corpórea devem-se à queda do acúmulo de gordura (lipogênese) e não efetivamente à mobilização da gordura já acumulada nos adipócitos (lipólise) (PARIZA; PARK; COOK, 2001; KIM et al., 2002; OSTROWSKA et al., 2003).

No tecido muscular, os efeitos do CLA são menos compreendidos (PARIZA; PARK; COOK, 2001). A massa muscular, contudo, parece ser preservada ou aumentada como resultado de mudanças induzidas por *t10,c12*-CLA na regulação e/ou ativação de fator α de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina-1 (IL-1), citocinas que afetam profundamente o catabolismo dos músculos esqueléticos, assim como a função imune (PARIZA; PARK; COOK, 2000). Com a administração de uma combinação de isômeros em uma proporção selecionada para alcançar os benefícios desejáveis atribuídos a um isômero e neutralizar os efeitos indesejáveis dele mesmo, os animais tratados exibem eficiência alimentar melhorada e ganho de peso contínuo ou aumento da massa magra, enquanto a gordura corporal é reduzida (WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION, 2000). Inúmeros trabalhos relatam o aumento do acúmulo de massa magra relativamente ao ganho de gordura em animais como camundongos, ratos e porcos (PARK et al., 1997; AZAIN et al., 2000; DUGAN et al., 1999; OSTROWSKA et al., 1999).

O uso do CLA tem sido particularmente interessante na pecuária, levando-se em conta composição corporal de animais e lactação (BAUMAN; GRIINARI, 2003). Em suínos sob diversas condições, trabalhos indicam modificações corporais no sentido de aumento do peso magro e diminuição da gordura subcutânea em tratamentos que incluem CLA (DUGAN et al., 1997; DUNSHEA et al., 1998; O'QUINN et al., 2000; EGGERT et al., 2001; DEMAREE et al., 2002; WIEGAND et al., 2002). Dietas ricas em ácido linoleico ou outros ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs, *Polyunsaturated fatty acids*), como aqueles presentes em alguns óleos podem elevar a concentração de CLA no leite de vacas (GRIINARI et al., 1998; KELLY et al., 1998; CHOUINARD et al., 1999; MEDEIROS et al., 2000; MEDEIROS et al., 2010).

Em trabalho desenvolvido por Baumgard et al. (2000) com vacas leiteiras, a suplementação com *t10,c12*-CLA resultou em 42% e 44% de decréscimo na percentagem e na produção de gordura no leite, respectivamente. Esse isômero é, logo, considerado potente inibidor da síntese de gordura no leite. Outro efeito que torna *t10,c12*-CLA bastante promissor é a melhoria no desempenho reprodutivo de vacas quando incluído na dieta durante o início da lactação (DE VETH et al., 2009). A probabilidade de gravidez aumentou em 26% (de 72% para 91%), enquanto o tempo de concepção foi reduzido em 34 dias (de 151 para 117 dias) com a suplementação com *t10,c12*-CLA. No geral, houve forte concordância da natureza de resposta com a dose ótima de suplementação prevista no tempo da primeira ovulação, da concepção e no sucesso da gravidez.

2.6 Isomerase do ácido linoleico

Ácidos graxos poli-insaturados presentes na dieta de animais são potentes inibidores do crescimento de bactérias da flora ruminal (DEVILLARD; ANDANT; WALLACE, 2006). Como estratégia de defesa, esses microrganismos desenvolveram uma maquinaria protetora de bio-hidrogenação, que elimina as duplas ligações dos PUFAs e os convertem em ácidos graxos saturados. Dentro da categoria de PUFAs, o CLA, é o primeiro intermediário na bio-hidrogenação de *c12*-LA e o processo foi descrito pela primeira vez em estudos com bactéria ruminal *Butyrivibrio fibrisolvens* (KEPLER et al., 1966).

Até o presente, pelo menos cinco isomerases de PUFAs foram identificadas. A única isomerase eucariótica estudada é a da alga vermelha *Ptilota filicina*, que tem como substrato o ácido eicosapentaenoico (*c5,c8,c11,c14,c17*-EPA; 20:5^{Δ5Z,8Z,11Z,14Z,17Z}) e gera um composto com ligação conjugada (*c5,c7,c11,c14,c17*-EPA; 20:5^{Δ5Z,7Z,11Z,14Z,17Z}). Em análise de expressão funcional, a atividade da enzima foi detectada em tecidos de plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* apenas por ensaio *in vitro* e nenhum PUFA conjugado foi acumulado nos lipídios das sementes (ZHENG et al., 2002).

As isomerases de PUFA procarióticas usam ácido linoleico para produzir diferentes CLAs. Essas enzimas bacterianas são ditas isomerases do ácido linoleico ou linoleato isomerases. O estudo mais detalhado de uma isomerase que produz *c9,t11*-CLA (9,11-isomerase) refere-se à análise de extratos de membrana de *B. fibrisolvens* (KEPLER et al., 1966; KEPLER; TOVE, 1967; KEPLER; TUCKER; TOVE, 1971). Usando ácidos graxos diferentes quanto ao grupo polar e à posição de dupla ligação, pesquisadores demonstraram que a atividade da isomerase de *B. fibrisolvens* é baseada na presença de grupo carboxílico livre e no reconhecimento de sistema de dupla ligação *c9,c12* no substrato. Ácidos graxos com mais de 18 carbonos não foram usados como substrato por essa enzima. O mecanismo de isomerização do LA envolve remoção de hidrogênio do C11 e transferência do próton para o C13 do substrato.

Várias espécies do gênero *Lactobacillus* podem converter LA em CLA, porém, ao contrário da isomerase de *B. fibrisolvens*, quantidades muito variáveis de *c9,t11*-CLA podem ser encontradas nos produtos da reação (ALONSO; CUESTA; GILLILAND, 2003; IRMAK et al., 2006). Nos casos específicos de *L. acidophilus*, a sequência correspondente à isomerase do ácido linoleico foi depositada em banco de dados (HENAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, 2005) e a isomerase de *L. reuteri* também foi estudada (ARKION LIFE SCIENCES, 2001).

Experimentos *in vitro* com *Bifidobacterium* e *Clostridium* (DEVILLARD et al., 2007) mostraram que microrganismos destes gêneros também foram capazes de produzir CLA, porém a identidade das enzimas e possíveis intermediários envolvidos na isomerização não estão definidos até o presente, salvo para *C. sporogenes* (PENG et al., 2007).

Um exemplo bem caracterizado de uma isomerase do ácido linoleico é a de *Propionibacterium acnes* (BIO-TECHNICAL RESOURCES, 2001), uma bactéria comensal da pele humana, envolvida com formação de acne, e cujo genoma foi completamente sequenciado (BRÜGGEMANN et al., 2006) e está acessível em banco de dados público. Diferentemente das 9,11-isomerases de *B. fibrisolvens*, *C. sporogenes*, *L. acidophilus*, *L. reuteri*, que são proteínas associadas com membranas, a isomerase do ácido linoleico de *P. acnes* (PAI) pertence à família de 10,12-isomerases e é uma enzima solúvel. Monomérica e formada por 424 resíduos de aminoácidos, a estrutura de PAI em complexação com seu produto *t*10,*c*12-CLA indica que essa enzima é uma riboflavina e contém flavina-adenina dinucleotídeo (FAD) ligado de modo não covalente quando revelada por cristalização. No complexo proteína-*t*10,*c*12-CLA, o ácido graxo adota uma conformação fortemente curvada em forma de U dentro de um canal altamente hidrofóbico de ligação ao substrato (LIAVONCHANKA et al., 2006). Alinhamento das isomerases de *L. acidophilus*, *P. filicina* e *P. acnes* mostrou similaridade em torno de 12%, sendo que a região mais fortemente conservada é o domínio N-terminal de ligação a FAD, incluindo o motivo canônico GxGxxG(x)₁₈ de ligação a nucleotídeo (DYM; EISENBERG, 2001; LIAVONCHANKA; FEUSSNER, 2008). Apesar disso, a comparação de parâmetros cinéticos e de transferência de prótons indica que a organização dos sítios ativos das 9,11-isomerases e 10,12-isomerases seja distinta.

Empregando *E. coli* como sistema procariótico de expressão, Hornung et al. (2005) produziram PAI, purificaram-na e geraram anticorpos para estudos em eucariotos. A enzima recombinante mostrou pH ótimo em torno de 7,0 e o substrato preferido foi *c*9,*c*12-LA, que foi convertido exclusivamente em *t*10,*c*12-CLA (Figura 2). Diferente da 9,11-isomerase de *B. fibrisolvens*, essa 10,12-isomerase aceita PUFA's de cadeia longa como substrato e a formação de trienos conjugados a partir de ácido linolênico (*c*9,*c*12,*c*15-ALA), ácido araquidônico (*c*5,*c*8,*c*11,*c*14-AA; 20:4^{Δ5Z,8Z,11Z,14Z}) e ácido docosaexaenoico (*c*4,*c*7,*c*10,*c*13,*c*16,*c*19-DHA; 20:6^{Δ4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z}) foi confirmada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), espectrometria de massa (MS) e ressonância magnética nuclear (NMR).

Nos eucariotos, a maior parte dos ácidos graxos é esterificada para formar lipídios de membrana como fosfolipídios ou lipídios de armazenamento como triacilgliceróis; porém LA esterificado em fosfatidilcolina, metil, acil-CoA ou triacilglicerol não foram aceitos como substrato. Quanto ao comprimento e grau de insaturação do ácido graxo, os resultados indicam que a enzima analisada é promíscua e admite somente moléculas livres (HORNUNG et al., 2005). Estudos detalhados de caracterização molecular de PAI pela expressão em *E. coli* também foram conduzidos por Deng et al. (2007) e Rosberg-Cody et al. (2007), estes últimos ainda fornecendo informações complementares do funcionamento da enzima recombinante em *Lactococcus lactis*.

Figura 2 – Reação catalisada por PAI na conversão de *c9,c12*-LA (LA 18:2^{Δ9Z,12Z}) em *t10,c12*-CLA (CLA 18:2^{Δ9E,12Z}) (LIAVONCHANKA et al., 2006)

Como modelo para expressão da forma ativa de PAI em um sistema eucariótico, a célula de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) foi inicialmente escolhida. Hornung et al. (2005) avaliaram o gene *pai* bacteriano e uma versão com códons otimizados para sistema eucariótico, denominada *copai*. Nas células de levedura transformadas com *pai*, detectou-se o isômero *t10,c12*-CLA em 0,5% de todos os ácidos graxos esterificados, enquanto nas células-coPAI esse valor estava em torno de 4,3%, representando um aumento de mais de 8 vezes. Esses mesmos pesquisadores realizaram a transformação de tabaco, planta cujas sementes têm ácido linoleico como ácido graxo principal e, portanto, como possível precursor do CLA. Foram empregadas construções com os genes *pai* ou *copai* dirigidos pelo promotor constitutivo CaMV 35S

(*Cauliflower mosaic virus* 35S) ou promotor semente-específico USP (*unknown seed protein*). Apenas as sementes das plantas-coPAI produziram *t10,c12*-CLA. A quantidade de *t10,c12*-CLA detectada nos ácidos graxos esterificados foi de até 0,1% nas plantas CaMV 35S-coPAI e de até 0,3% em USP-coPAI. Na fração de ácidos graxos livres das plantas USP-coPAI, atingiu até 17,1%.

Com o intuito de avaliar a produção de CLA em sementes com maior conteúdo de ácidos graxos livres, Kohno-Murase et al. (2006) transformaram plantas de arroz com construções que continham o promotor da oleosina 18 kDa de arroz (Ole 18) ou o promotor do gene da globulina do embrião de arroz (REG-2) dirigindo a expressão de *pai*. Houve acúmulo *t10,c12*-CLA em valores médios de 0,01% (valor máximo 0,16%) dos lipídios totais das sementes das plantas com promotor de globulina dirigindo a expressão do transgene e 1,32% (valor máximo 1,6%) dos lipídios das sementes das plantas em que transcrição de *pai* foi regulada pelo promotor da oleosina. Além disso, os autores relataram que, da quantidade total desse isômero, 70% estavam incorporados em triacilgliceróis e 28% ocorriam na forma de ácido graxo livre. Apesar de aparentemente baixos, os valores produzidos em plantas transgênicas são equivalentes à quantidade de *t10,c12*-CLA encontrada em leite e carne (FRITSCHKE et al., 1999) e em quantidades suficientes para avaliação de efeitos fisiológicos (OHNUKI et al., 2001).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi essencialmente desenvolvido no Laboratório de Melhoramento de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, SP.

3.1 Material biológico

A cepa de *Propionibacterium acnes* ATCC6919, fornecida pela Fundação André Tosello FAT), Campinas, SP, foi utilizada para isolamento do gene da isomerase do ácido linoleico (*pai*). Para clonagem gênica, empregaram-se o vetor pGEM-T (Promega) e as cepas de *E. coli* DH10B ou TOP10 (Invitrogen). Para expressão heteróloga, o referido gene foi clonado no vetor pET-28a (Promega) e introduzido em *E. coli* BL21 (DE3) ou BL21-*CodonPlus* (Stratagene).

As cultivares de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) cultivadas *in vitro* foram ‘CTC2’, mantida no CENA, Piracicaba, SP, ‘IAC86-2480’, ‘IACSP93-3046’, ‘IACSP94-2094’, ‘IAC95-5000’, fornecidas pela Dra. Silvana Creste Souza do Centro de Cana do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Ribeirão Preto, SP, e ‘RB855156’, ‘RB855536’, ‘R855453’, ‘RB867515’ do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Araras, SP. Para avaliação de expressão transiente em cana-de-açúcar foi empregado o vetor pAHC27 (CHRISTENSEN; QUAIL, 1996), que contém o gene repórter *uidA* (*gus*). Para clonagem gênica visando à expressão estável, as construções de interesse foram desenvolvidas com base no vetor pAHC17 (CHRISTENSEN; QUAIL, 1996) modificado por Camargo (2007). A sequência de direcionamento para cloroplastos foi isolada a partir do vetor RecA-GFP (KÖHLER et al., 1997). O vetor pHA9, que contém o gene *nptII* (*neo* ou *aphA*), foi útil para seleção de transformantes resistentes à genética.

3.2 Extração de DNA genômico de *Propionibacterium acnes*

Da cultura de *P. acnes* em caldo BHI (1,75% infusão de cérebro e coração; 1% peptona proteose; 0,2% dextrose; 0,5% NaCl; 0,25% Na₂HPO₄; pH 7,4) recebida, 1 mL foi transferido para um tubo e centrifugado a 16.000 g por 5 min. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado de células foi resuspenso em 500 µL de tampão TE [10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) pH 8,0] e novamente centrifugado. Após eliminação do sobrenadante, o precipitado foi resuspenso no mesmo de volume de TE com adição de 100 µL de

10% SDS e 500 mg de sílica (SiO₂, 0,1 mm de diâmetro) seguindo-se de agitação em homogeneizador de células (Ação Científica) por 30 s. O DNA foi purificado pelo método fenol-clorofórmio (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Foram acrescentados 500 µL de fenol saturado e procedeu-se homogeneização com posterior centrifugação a 16.000 g por 10 min. A fase superior foi transferida para novo tubo e foram adicionados ao mesmo 500 µL de fenol:clorofórmio (1:1), seguindo as mesmas condições de agitação e centrifugação. Os procedimentos foram repetidos com um volume igual de clorofórmio. Transferiu-se a fase superior para novo tubo e foram adicionados 300 µL de isopropanol e 50 µL de 3 M acetato de sódio pH 5,2, com homogeneização e nova centrifugação por 5 min. Descartado o sobrenadante, foram adicionados 300 µL de 70% etanol e conduziu-se nova centrifugação. Com a exclusão da fase líquida, o precipitado foi seco a 55°C por 10 min e acrescentaram-se 50 µL de água Milli-Q autoclavada ao tubo, que foi armazenado a -20°C.

3.3 Análise e quantificação de DNA

A amostra de DNA foi diluída a 1:10 em água Milli-Q autoclavada e adicionado a ela tampão de carregamento 1× (10×: 0,25% azul de bromo-fenol; 0,25% xilenocianol; 15% ficol 400) com *SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain*. O DNA foi visualizado em luz ultravioleta (302 nm) após eletroforese em gel 0,8% agarose em tampão SB (5 mM borato deca-hidratado de sódio pH 8,0) (BRODY; KERN, 2004) a 3 V/cm. A imagem do gel foi adquirida com câmera digital e processada com o programa Kodak Digital Science 1D (Kodak). A quantificação de DNA foi realizada com leitura de amostra em fluorômetro Hoefer DyNA Quant 200 (Hoefer).

3.4 PCR para clonagem gênica

Com base no *National Center of Biotechnology Information* (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov), buscou-se a sequência codificadora completa do gene da isomerase do ácido linoleico de *P. acnes* (*pai*, *P. acnes isomerase*, ou *lai*, *linoleic acid isomerase*), tendo sido a primeira denominação e abreviação adotadas para uso no presente trabalho. Para a sequência encontrada (acesso AX062088), pares de oligonucleotídeos ‘*pai1*’ foram desenvolvidos, tendo sido incluído sítio para reconhecimento por *NdeI* no oligonucleotídeo *sense* e *XhoI*, no oligonucleotídeo *antisense*, objetivando a clonagem direcional do gene *pai* de 1275 pb para posteriores experimentos de expressão heteróloga (Tabela 1).

Tabela 1 – Oligonucleotídeos utilizados no presente trabalho

Nome	Sequência (5'-3')	Acesso	Posição
<i>pai1 sense</i>	CAGAC <u>CATATG</u> TCC ATC TCG AAG GAT TC	AX062088	1
<i>pai1 antisense</i>	CTATC <u>TCGAG</u> TCA CAC GAA GAA CCG CGT C	AX062088	1275
<i>pai2 sense</i>	C <u>GAGCTC</u> ATG TCC ATC TCG AAG GAT TC	AX062088	1
<i>pai2 antisense</i>	GGGGT <u>ACC</u> TCA CAC GAA GAA CCG CGT C	AX062088	1275
<i>rec sense</i>	C <u>GGGATCC</u> ATG GAT TCA CAG CTA GTC TT	NM_106566	1
<i>rec antisense</i>	C <u>GAGCTC</u> TTT TCT GTC ATC GAA TTC AG	NM_106566	204
<i>nptII sense</i>	GAG GCT ATT CGG CTA TGA CTG	GU734659	51
<i>nptII antisense</i>	ATC GGG AGC GGC GAT ACC GTA	GU734659	750
<i>pubi1 sense</i>	GCC CTG CCT TCA TAC GCT ATT	S94464	1911
<i>pai antisense</i>	TCA CAC GAA GAA CCG CGT	AX062088	1275
<i>ubi2 sense</i>	CTT CTT CTG TCC CTC CGA TG	TC56667	-
<i>ubi2 antisense</i>	TCC AAC CAA ACT GCT GCT C	TC56667	-
<i>cis sense</i>	TGG CTT TGG TGG TGT TGT	TC112757	-
<i>cis antisense</i>	CAG AGG GAC ATC TAT GGG A	TC112757	-
<i>paiRT sense</i>	CCA GCA GTA CAT GGT GGA TG	AX062088	834
<i>paiRT antisense</i>	GGC ACT CCT CCT GAG TCT TG	AX062088	1033
<i>recRT sense</i>	TGA ATC CAA GCT TCA CTC CTC	NM_106566	32
<i>recRT antisense</i>	CGT AGA CGG TAA CCG GAG AA	NM_106566	154

Os caracteres sublinhados representam sítios de restrição

A avaliação da estabilidade dos oligonucleotídeos foi conduzida com base no programa NetPrimer (www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html) e, quando conveniente, foram adicionados nucleotídeos em 5', a fim de otimizar o rendimento de restrições

enzimáticas, de acordo com sugestões fornecidas pelo fabricante das endonucleases. Todas as sequências estudadas neste trabalho foram avaliadas *a priori* com auxílio do programa pDRAW32 (www.acaclone.com) para os sítios de restrição existentes.

Para a clonagem de *pai*, 50 ng de DNA genômico foram submetidos a amplificação com 1,0 U de *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen), 1× *High Fidelity PCR Buffer*, 0,2 mM cada dNTP, 2,0 mM MgSO₄, 0,2 µM cada oligonucleotídeo em um volume de 50 µL. Em termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems), foram empregadas as condições de 94°C por 2 min, 94°C por 30 s, 55°C por 1 min, 72°C por 3 min (30 ciclos); a reação foi brevemente interrompida para adição de 10 U de *Taq DNA Polymerase* e 0,2 mM dATP e finalizou-se a 72°C por 7 min. Um volume de 3 µL da amostra foi verificado em gel 0,8 ou 1% agarose em tampão SB como no item 3.3 e o restante da PCR foi purificada com *kit GFX Gel Band Purification* (Amersham Biosciences) conforme recomendado pelo manual.

3.5 Clonagem gênica

Com o produto de PCR *pai*, foi feita ligação do fragmento purificado ao vetor pGEM-T *Easy* (Promega) (Figura 3) e gerada a construção pGPAI.

Figura 3 – Mapa do vetor pGEM-T *Easy* (Promega)

3.5.1 Ligação de inserto a vetor

Para a reação de ligação do inserto, uma mistura de 3 U de T4 DNA Ligase (Promega), 2× *Rapid Ligation Buffer*, 50 ng de vetor e inserto (fragmento) ajustado a uma proporção molar de inserto:vetor (3:1) em um volume de 10 µL foi produzida. Os componentes foram mantidos por 16 h a 4°C e, em seguida, armazenados a -20°C ou empregados imediatamente na transformação de *E. coli* pelo método de eletroporação.

3.5.2 Transformação de células eletrocompetentes de *Escherichia coli*

Em um tubo de 1,5 mL, contendo 40 µL de células eletrocompetentes de *E. coli*, foi adicionado 1 µL de reação de ligação. Após ligeira homogeneização, a mistura de células e DNA foi transferida para uma cubeta de eletroporação (0,1 cm), previamente resfriada em gelo. A mesma foi colocada em eletroporador (Micropulser, BIO-RAD) e um pulso de corrente elétrica de 1,8 kV foi aplicado. Imediatamente, foi adicionado à cubeta, 1 mL de meio SOC (2% triptona; 0,5% extrato de levedura; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄ filtro-esterilizados; 20 mM glicose filtro-esterilizada; pH 7,0). Após breve mistura, o conteúdo da cubeta foi transferido para um novo tubo e incubado, sob agitação de 120 rpm, a 37°C por 1 h. Em seguida, centrifugou-se a 2000 g por 5 min. O sobrenadante foi descartado, deixando restar apenas 200 µL, necessário para resusender o precipitado de células. O volume foi plaqueado em meio LB (1% triptona; 0,5% extrato de levedura; 171 mM NaCl; 1,3% ágar; pH 7,0) com 100 µg/mL ampicilina. Foram espalhados sobre o meio de cultura LB sólido os compostos para seleção dos transformantes recombinantes, isto é, 20 µL de 50 mg/mL bromo-cloro-indolil-galactopiranosídeo (X-gal) e 40 µL de 100 mM isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG). As placas foram incubadas em estufa a 37°C durante 12-16 h.

3.5.3 Armazenamento de clones

As colônias transformantes putativas foram inoculadas em tubos de ensaio com 5 mL de meio LB, contendo ampicilina na mesma concentração anterior. Após cultivo a 37°C, em agitador a 120 rpm por 12-16 h, um volume de 500 µL da cultura foi reservado e adicionado, em condições assépticas, a um mesmo volume de glicerol 50% autoclavado. Após homogeneização, o tubo foi imerso em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C.

3.5.4 Minipreparação de DNA plasmidial

Do volume remanescente da cultura líquida estocada, transferiram-se 2,0 mL para um novo tubo e centrifugou-se a 16.000 g por 1 min. Descartado o sobrenadante, o procedimento foi repetido mais uma vez, usando-se o mesmo tubo para aumentar o rendimento da minipreparação. Em seguida, o precipitado de células de cada tubo foi totalmente resuspenso em 200 µL de solução I (50 mM glicose; 25 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA) com forte agitação, incubando-se à temperatura ambiente por 10 min. Em seguida, adicionaram-se 200 µL de solução II [0,2 M NaOH; 1,0% dodecil sulfato de sódio (SDS)], com mistura por inversão e incubação à temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, foram acrescentados 200 µL de solução III (3 M acetato de potássio pH 5,5), misturando-se por inversão e incubando-se no gelo por 5 min. Centrifugou-se por 10 min o sobrenadante foi transferido para tubo novo, ao qual foram adicionados 500 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) gelado e misturou-se por inversão. Com nova centrifugação por 5 min, a fase superior foi transferida para outro tubo e acrescido a ela 500 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), com mistura e centrifugação por 1 min. A nova fase superior foi coletada em novo tubo e adicionado a ela 1 mL de etanol absoluto gelado e o material foi mantido a -20°C por 30 min, seguindo-se centrifugação por 5 min. O líquido sobrenadante foi descartado e nova lavagem do precipitado foi feita com 500 µL de 70% etanol com mais uma centrifugação como a anterior. O tubo foi mantido à temperatura ambiente até que as amostras secassem. Posteriormente, as amostras foram resuspensas em 30 µL de TE com 50 mg/mL ribonuclease A (RNase A) e incubadas a 37°C por 15 min.

3.5.5 Confirmação de clonagem por PCR, restrição enzimática e sequenciamento de DNA

A presença de inserto foi confirmada nos plasmídeos por meio de PCR com oligonucleotídeos específicos e reagentes em concentrações-padrão. As reações ocorreram com 10 ng de DNA plasmidial, 1 U de *Taq* DNA Polymerase recombinant (Fermentas), 1× *Taq* Buffer with KCl, 0,2 mM cada dNTP, 2,0 mM MgCl₂, 0,2 µM cada oligonucleotídeo em um volume de 25 µL. Para seleção de colônias transformantes com o fragmento de interesse, eventualmente, realizou-se PCR de colônia com 1 µL do volume obtido de cada colônia cultivada por 12-16 h em meio LB líquido, que foi adicionado em 4 µL de água Milli-Q autoclavada. A diluição foi

previamente tratada a 95°C por 5 min em termociclador, seguindo-se com PCR como anteriormente, e das colônias PCR-positivas extraiu-se o plasmídeo recombinante.

A restrição enzimática foi iniciada a partir de 1 µg de DNA plasmidial, 1 U da enzima de restrição *EcoRI*, 1× tampão adequado, 50 ng/µL albumina do soro bovino (BSA) e água Milli-Q autoclavada em volume de 20 µL em banho-maria a 37°C por 1 h. As amostras foram analisadas como no item 3.3.

Para o sequenciamento dos fragmentos ligados nos vetores, as amostras de DNA foram submetidas ao seguinte protocolo de reação, seguindo orientações do *kit* DYEnamic ET *Terminator Cycle Sequencing* (Amersham Biosciences): 100-150 ng de DNA, 1× tampão *save* \$, 1,0 µL *mix kit*, 0,25 µM oligonucleotídeo ‘T7’, ‘SP6’ ou um dos oligonucleotídeos produzidos no presente trabalho e água Milli-Q autoclavada para volume final de 10 µL. A reação foi submetida a 95°C por 20 s, 50°C por 15 s, 60°C por 1 min (30 ciclos) em termociclador. Posteriormente, as amostras foram submetidas ao processo de precipitação. Para isso, foram adicionados 80 µL de 65% isopropanol, seguindo-se com leve agitação. A mistura foi incubada à temperatura ambiente, no escuro, por 15 min. Centrifugou-se a 16.000 g por 30 min. O sobrenadante foi descartado com auxílio de micropipeta. Adicionaram-se 150 µL de 60% etanol gelado. Seguiu-se nova centrifugação por 15 min. Novamente o sobrenadante foi descartado e, então, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente, no escuro, por 1 h e, em seguida, armazenadas a -20°C até o sequenciamento. Para carregamento no sequenciador ABI PRISM 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems), a cada tubo foram acrescentados 10 µL de formamida, seguindo-se com agitação.

Às sequências de nucleotídeos produzidas pelo equipamento, aplicou-se *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST, blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) para verificar similaridade com dados depositados no NCBI. Quando possível, *contigs* foram gerados com auxílio do programa *Dna Baser* (www.dnabaser.com) e alinhados com acessos do NCBI pelo uso da ferramenta *ClustalW Multiple alignment*, disponível no programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html).

3.6 Construção de vetor para expressão em *Escherichia coli*

O gene *pai* anteriormente clonado em pGEM-T *Easy* (pGPAI) foi isolado e subclonado no vetor pET-28a (Promega) (Figura 4), produzindo a construção pEPAI para expressão heteróloga.

O vetor pET-28a apresenta região para clonagem e expressão que possui promotor T7, sítio de policlonagem, terminador T7, cauda de histidina (His), sítio para clivagem com trombina e cauda T7. Estão também presentes em pET-28a, gene que confere resistência à canamicina (*kan*) e sequência para anelamento de oligonucleotídeo 'T7' *sense*.

Para tanto, após quantificação, uma alíquota da construção pGPAI foi digerida com *NdeI* e *XhoI* e a amostra foi resolvida em gel 0,8% agarose em SB como no item 3.3. O fragmento de interesse foi isolado e purificado. Paralelamente, o vetor pET-28a foi submetido à restrição enzimática. Para precipitar o vetor digerido, foram adicionados um volume de 3 M acetato de sódio pH 5,2 equivalente a 10% do volume da amostra e 2,5 volumes de etanol absoluto e o tubo foi incubado a -20°C por 30 min. A amostra foi centrifugada a 16.000 g por 15 min a 4°C. Lavagem foi feita com 500 µL de etanol 70% e centrifugou-se novamente. O precipitado foi seco a 37°C e resuspenso em 10 µL de água Milli-Q autoclavada.

Figura 4 – Mapa do vetor pET-28a (Promega)

A ligação foi feita como no item 3.5.1. Células eletrocompetentes de *E. coli* DH10B ou TOP10 (Invitrogen) foram transformadas e plaqueadas, dessa vez, em LB sólido com 50 µg/mL

canamicina. Após extração de DNA plasmidial, a subclonagem de *pai* em pET-28a para geração de pEPAI foi confirmada por PCR com oligonucleotídeos específicos 'pai1', digestão com *Xba*I e *Xho*I e sequenciamento com oligonucleotídeo 'T7' conforme o item 3.5.5.

3.6.1 Transformação de células quimiocompetentes de *Escherichia coli*

Células quimiocompetentes de *E. coli* BL21 (DE3) ou BL21-*CodonPlus* (Stratagene), apropriadas para expressão heteróloga foram empregadas. O processo de transformação foi iniciado pela adição de 2 µL da solução contendo pEPAI a 100 µL de célula quimiocompetente em tubo. A mistura foi incubada em gelo por 30 min. Em seguida, foi submetida a choque térmico a 42°C por 90 s, posteriormente incubando-se em gelo por 2 min. Um volume de 1 mL de LB líquido foi adicionado ao tubo e este foi incubado a 37°C por 1 h em agitação constante. Após esse período, as culturas de bactérias transformadas foram centrifugadas a 0,4 g por 5 min, 900 µL da suspensão foram descartados e resuspendeu-se o precipitado no meio líquido remanescente. A suspensão de células foi plaqueada em meio LB sólido com 50 µg/mL canamicina, no caso de BL21 (DE3), ou 50 µg/mL canamicina e 34 µg/mL cloranfenicol, para BL21-*CodonPlus*, e incubou-se a 37°C por 12-16 h. As colônias transformantes putativas foram confirmadas por PCR de colônia como no item 3.5.5.

3.6.2 Indução de expressão em *Escherichia coli*

As linhagens de *E. coli* utilizadas nos experimentos de expressão heteróloga contêm uma cópia cromossomal do gene da T7 RNA polimerase (T7 gene 1), controlado pelo promotor lac, que normalmente está suprimido por conta da ação de repressor. A adição de IPTG ao meio de cultura libera o promotor e permite que a RNA polimerase de *E. coli* transcreva o gene da T7 RNA polimerase. Quando essa última enzima é produzida, o gene alvo é transcrito, pois este está clonado abaixo do promotor T7 contido no vetor pET.

Uma colônia da bactéria *E. coli* BL21 (DE3) ou BL21-*CodonPlus* contendo pEPAI ou pET28a, foi inoculada, separadamente, em 5 mL de meio LB, contendo os antibióticos apropriados para cada caso (item 3.6.1). Após 16 h de crescimento a 37°C com agitação, 500 µL da cultura foram utilizados como um novo inóculo para um volume de 50 mL de meio LB contendo canamicina. Quando a cultura atingiu uma densidade óptica a 600 nm (DO₆₀₀) de 0,5 (após aproximadamente 5 h) uma alíquota de 2 mL foi reservada. A amostra foi centrifugada a

16.000 g por 2 min e, após descarte do sobrenadante, o precipitado de células foi conservado a -20°C. Em seguida, ao volume restante foi acrescido IPTG para uma concentração final de 1 mM e novas alíquotas foram reservadas periodicamente. Concentração de 0,3 mM de IPTG e temperatura de 20°C também foram testadas.

3.6.3 Lise celular por choque térmico

Os precipitados derivados das alíquotas obtidas das culturas foram resuspensores em 200 µL de tampão de lise [10 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 5 mM ditioneitol (DTT); 1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF); 10 mg/mL lisozima]. Após incubação em gelo por 30 min, as amostras foram incubadas em nitrogênio líquido durante 10 s e, sequencialmente, em banho-maria a 37°C por mais 10 s, com alternância das etapas por 10 vezes. A seguir, as suspensões foram centrifugadas a 16.000 g por 2 min, sendo o sobrenadante transferido para um novo tubo (fração solúvel do extrato proteico) e o precipitado mantido no tubo original (fração insolúvel do extrato proteico).

3.6.4 SDS-PAGE

Os extratos proteicos foram, isoladamente, acrescentados de tampão dissociante (6,25 mM Tris-base pH 8,9; 20% glicerol; 2% SDS; 5% β-mercaptoetanol; 0,025% azul de bromo-fenol) na proporção 1:1 e aquecidos a 100°C por 10 min, sendo então submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) em sistema *Mini PROTEAN II Electrophoresis Cell* (BIO-RAD). O gel de poliacrilamida é composto por dois tipos de géis: o gel de resolução [10-12,5% acrilamida; 750 mM Tris-base pH 8,9; 0,025% persulfato de amônio; 0,2% tetrametiletenodiamina (TEMED); 0,1% SDS] e o gel de empacotamento (4% acrilamida; 125 mM Tris-base pH 6,7; 0,2% persulfato de amônio; 0,2% TEMED; 0,1% SDS). Foram empregadas condições desnaturantes em tampão de eletroforese (25 mM Tris-base; 192 mM glicina; 0,1% SDS; pH 8,3), conforme propostas por Laemmli (1970). Uma corrente de 15 mA por gel foi empregada e, após a eletroforese, os géis foram tratados com solução corante (0,1% *Coomassie brilliant blue* R-250; 40% metanol; 7% ácido acético glacial) por pelo menos 1 h. A descoloração foi feita utilizando a solução descorante (25% metanol; 7% ácido acético glacial).

3.6.5 Eletroeluição e diálise

Para purificação por eletroeluição, um novo gel foi preparado. A banda correspondente à proteína recombinante foi cortada da parte não corada desse gel, usando-se como referência uma pequena parte do gel que foi corada separadamente. Utilizou-se eletroeluidor modelo 422 (BIO-RAD) com tampão de eletroforese com corrente de 10 mA por 5 h. A solução de proteína eletroeluída foi recolhida e acondicionada em um saco de diálise previamente tratado com solução fervente (238 mM NaHCO_3 ;3 mM EDTA) por 15 min e resfriado em água Milli-Q. O sistema foi mantido em tampão de eletroforese sem SDS com agitação, que foi substituído por novo tampão após 2 h. Nova troca de tampão foi feita e manteve-se o sistema por mais 2 h. A diálise prosseguiu por mais 12-16 h após última troca de tampão. A proteína purificada foi recolhida em um tubo.

3.6.6 Quantificação de proteína

A amostra foi quantificada pelo método de Bradford (1976). Para isso, 20 μL da solução de proteína foram misturados com 1 mL de reagente de Bradford (1% *Coomassie brilliant blue* G-250; 4,75% etanol; 8,5% H_3PO_4 ; filtrado) e lidos a 595 nm. O cálculo da concentração de proteína na amostra foi baseado na curva padrão estabelecida com diluições serias de BSA de 0,1 mg/mL a 1,0 mg/mL lidas a 280 nm.

3.6.7 Sequenciamento de proteína

O sequenciamento foi feito no Laboratório de Proteômica do Centro de Biotecnologia e Genética, Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, BA. A uma alíquota de 1 μg de proteína foram adicionados 10 μL de 50 mM NH_4HCO_3 e 2,5 μL de 100 mM DTT e agitou-se vigorosamente. O tubo foi incubado a 60°C por 30 min e resfriado a temperatura ambiente. Um volume de 2,5 μL de 300 mM iodoacetamida foi adicionado e o tubo mantido no escuro por 30 min. A amostra foi digerida com 3 μL de 25 ng/ μL tripsina (*Trypsin gold*, Promega) a 37°C por 12-16 h. O volume foi reduzido a 10-15 μL em liofilizador e utilizado para sequenciamento no equipamento *Micromass ESI-Q-TOFF Micro* (Waters).

3.6.8 Extração, metilação e análise de ácidos graxos em *Escherichia coli*

Para avaliar o perfil de ácidos graxos, foram empregados 70 µL da fração solúvel e parte da fração insolúvel de uma mesma alíquota de células de *E. coli* BL21 (DE3)-*CodonPlus* que apresentou a proteína expressa após indução com 0,3 mM IPTG a 20°C por 12-16 h. Em um tubo de vidro com amostra foi adicionado 1 mL de 2,5% H₂SO₄ em metanol e, após vedação, aqueceu-se a 90°C por 45 min. Foram então adicionados 500 µL de hexano e 500 µL de água com mistura vigorosa em agitador. Centrifugou-se a 16.000 g por 5 min e a fase superior foi armazenada a -20°C.

A metilação de ácidos graxos foi procedida no Laboratório de Óleos e Gorduras da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), USP, Piracicaba, SP, de acordo com modificações propostas a partir de Hartman e Lago (1973). Às amostras foram adicionados 4 mL de reagente de saponificação (0,5 N NaOH em metanol) com agitação vigorosa e aquecimento a 100°C por 5 min. O tubo foi resfriado a 30-40°C e foram adicionados 5 mL de reagente de esterificação (4 g de NH₄Cl; 6 mL de H₂SO₄; 120 mL de metanol) com novo aquecimento e resfriamento. Foram adicionados 5 mL de hexano e agitou-se vigorosamente por 30 s. Então, 5 mL de solução salina saturada (6 M NaCl) foram acrescentados e agitou-se manualmente. Após repouso, a fase superior foi coletada com pipeta Pasteur de vidro e transferida para novo tubo de vidro, com adição de 5 mL de água destilada e agitação manual. Após separação de fases, a fase superior foi recolhida como anteriormente e armazenada em tubo com injeção de N₂ gasoso e vedação.

As amostras metiladas foram injetadas em Cromatógrafo a gás HP 5890 série II com detector de ionização de chama do Laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental da ESALQ, USP, Piracicaba, SP. Foi utilizada coluna Supelco 2560 (Supelco), produzida com sílica fundida com 100 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,2 mm de polietilenoglicol. As condições cromatográficas utilizadas foram: temperatura inicial da coluna de 140°C por 2 min aumentando 4°C/min até 240°C e sendo assim mantida por 15 min; gás de arraste hélio em vazão 1,5 mL/min; temperatura do injetor de 250°C e temperatura do detector de 260°C. A identificação dos ácidos graxos foi realizada pela comparação do tempo de retenção dos ésteres metílicos dos ácidos graxos do padrão (Supelco mix C4-C24) com a amostra. Os dados foram analisados com o programa Shimadzu GC *solutions* (Shimadzu Co.).

3.7 Construções para transformação de cana-de-açúcar

3.7.1 pAHC27

Para testes experimentais preliminares de expressão transiente, foi empregado nos disparos exclusivamente o vetor pAHC27 (CHRISTENSEN; QUAIL, 1996) (Figura 5), que contém o gene repórter *uidA* (*gus*) e possibilita a realização de teste histoquímico (JEFFERSON; KAVANAGH; BEVAN, 1987). Assim como todos os vetores da série pAHC, pACH27 contém o promotor Ubi1, éxon ubi1, íntron ubi1 e terminador NOS do gene da nopalina sintase de *Agrobacterium*.

Figura 5 – Diagrama esquemático do vetor pAHC27. Sequências do promotor Ubi1 (linha reta em negrito). Éxon ubi1 (caixa preenchida). Íntron ubi1 (linha angulada). Gene repórter *uidA* da β -glucuronidase (caixa marcada com GUS). Sequência 3' não traduzida da nopalina sintase (caixa em branco). Sequência de pUC19 (linha angulada). Sítio de início da transcrição e direção (seta no éxon ubi1). *Bam*HI (B). *Eco*RI (E). *Hind*III (H). *Kpn*I (K). *Pst*I (P). *Sal*I (Sa). *Sac*I (Sc). *Sma*I (Sm). *Sph*I (Sp). *Xba*I (X). (CHRISTENSEN; QUAIL, 1996)

3.7.2 pAPAI

Em vias gerais, os procedimentos laboratoriais adotados nessa etapa ocorreram como nas clonagens anteriores. Para o desenvolvimento de construções visando à transformação genética de cana-de-açúcar escolheu-se o vetor pAHC17L1, que corresponde ao vetor pAHC17 (Figura 6) (CHRISTENSEN; QUAIL, 1996) modificado por Camargo (2007) pela inclusão dos sítios únicos de clonagem *Eco*RV, *Sac*I, *Mlu*I e *Kpn*I, nessa ordem, imediatamente à frente de *Bam*HI existente no vetor original.

Com base na sequência *pai* foram desenhados oligonucleotídeos 'pai2', que difere de 'pai1' por conta dos sítios de reconhecimento de enzimas de restrição. Sítio *Sac*I foi incluído no oligonucleotídeo *sense* e *Kpn*I, no *antisense* (Tabela 1). O fragmento *pai* foi amplificado a partir de DNA genômico de *P. acnes* (item 3.4), purificado e clonado em pGEM-T *Easy* (item 3.5), gerando pGPAI2. A partir desse ponto, esse vetor gerado foi digerido com *Sac*I e *Kpn*I e o

fragmento *pai* foi então subclonado em pAHC17L1 para produzir pAPAI (Figura 7A). As construções foram avaliadas com o programa pDRAW32. As colônias transformantes putativas selecionadas em LB com ampicilina foram avaliadas por PCR com o par de oligonucleotídeo ‘pai2’ e seus plasmídeos extraídos e submetidos a restrições enzimáticas com *EcoRI* e *HindIII* ou *KpnI* e *SacI*, que foram analisadas em gel 0,8% agarose em SB. Algumas amostras foram também submetidas a sequenciamento com os mesmos oligonucleotídeos.

Figura 6 – Diagrama esquemático do vetor pAHC17 (4899 pb). Sequências do promotor Ubi1 (linha reta em negrito). Éxon ubi1 (caixa preenchida). Íntron ubi1 (linha angulada). Sequência 3’ não traduzida da nopalina sintase (caixa em branco). Sequência de pUC19 (linha angulada). Sítio de início da transcrição e direção (seta no éxon ubi1). *BamHI* (B). *EcoRI* (E). *HindIII* (H). *PstI* (P). *SalI* (Sa). *SphI* (Sp). *XbaI* (X). O asterisco (*) indica o sítio B, à frente do qual foram inseridos os sítios *EcoRV*, *SacI*, *MluI* e *KpnI* para geração do vetor pAHC17L1 (4,9 kb). (CHRISTENSEN; QUAIL, 1996; CAMARGO, 2007)

3.7.3 pARPAI

Os primeiros 204 nucleotídeos correspondentes a 68 aminoácidos da sequência sinal da proteína de reparo de DNA *recA* de *Arabidopsis thaliana* (acesso NM_106556) contidos no vetor *RecA-GFP* (KÖHLER et al., 1997) foram utilizados com objetivo de direcionamento da proteína codificada por *pai* para cloroplasto na construção do vetor pARPAI (Figura 7B). Para tal, foram criados oligonucleotídeos com o sítio de restrição *BamHI*, no oligonucleotídeo ‘rec’ *sense*, e *SacI*, em ‘rec’ *antisense* (Tabela 1). O estabelecimento das condições de PCR foi conduzido com. As condições de amplificação foram estabelecidas com a ferramenta *Optimase ProtocolWriter* do site *MutationDiscovery.com* (www.mutationdiscovery.com): 94°C por 2 min, 94°C por 30 s, 52°C por 30 s, 72°C por 30 s, 72°C por 5 min (30 ciclos), 72°C por 5 min. O fragmento *rec* de 204 pb foi ligado em pAHC17L1 (item 3.5). Os oligonucleotídeos *pai2* foram utilizados para reamplificar a sequência *pai* com sítio *SacI* em 5’ e *KpnI* em 3’, que foi subclonada no vetor pAHC17L1, onde previamente estava clonada a sequência *rec*, produzindo-se pARPAI.

As sequências das construções finais foram avaliadas com os programas pDRAW32 e ORF *Finder* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>). As colônias transformantes putativas

foram verificadas por PCR com pares de oligonucleotídeos ‘pai2’ e ‘rec’ em 0,8 e 1,5% agarose em SB e seus plasmídeos extraídos e submetidos a restrições enzimáticas *EcoRI* e *HindIII* ou *KpnI* e *SacI*. Algumas amostras foram também submetidas a sequenciamento os oligonucleotídeos ‘pai2’ e ‘rec’ (item 3.5.5).

3.7.4 pHA9

O vetor pHA9 (Figura 7C) contém o promotor constitutivo *ubi1* dirigindo o gene *nptII* (*neo* ou *aphA*), útil como marca de resistência à geneticina para seleção de transformantes putativos, e terminador NOS. pHA9 foi digerido independentemente com *BamHI* e *EcoRI* para confirmação de identidade (item 3.5.5).

Figura 7 – Esquema representativo das construções utilizadas para transformação genética de cana-de-açúcar. A) pAPAI (6,2 kb). B) pARPAI (6,4 kb). C) pHA9 (5,7 kb). Promotor *ubi1*, éxon *ubi1* e íntron *ubi1* (Ubi). Isomerase do ácido linoleico (*pai*). *RecA* (*r*). Neomicina fosfotransferase II (*nptII*). Terminador nopalina sintase (N, em branco). *BamHI* (B). *BglIII* (Bg). *EcoRI* (E). *EcoRV* (Ec). *HindIII* (H). *KpnI* (K). *NaeI* (N, em preto). *PstI* (P). *SalI* (Sa). *SacI* (Sc). *SphI* (Sp). *TthI* (T). *XbaI* (X)

3.8 Transformação genética de cana-de-açúcar

3.8.1 Cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar

A metodologia de cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar foi essencialmente conduzida de acordo com os trabalhos de Bower e Birch (1992), Bower et al. (1996) e Falco, Tulmann Neto e

Ulian (2000). A região apical de plantas de cana-de-açúcar de 8 a 10 meses cultivadas em campo experimental foi coletada. Após a remoção de folhas externas, o cilindro de folhas imaturas enroladas que contém meristema apical (“palmito”) foi excisado e superficialmente desinfetado em 70% etanol por 1 min. Em condições assépticas, o material vegetal foi transferido para solução 2% hipoclorito de sódio por 20 min e, em seguida, foram feitas 3 lavagens em água destilada autoclavada. Após remoção de mais uma ou duas folhas até obter-se um cilindro de dimensões aproximadas de 100×30 mm, o “palmito” foi cortado em secções transversais de 2-3 mm de espessura. Os explantes foram cultivados em placas de Petri contendo meio MS₃ (HEINZ; MEE, 1969) modificado, que consiste em sais e vitaminas MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962); 2% sacarose; 0,05% caseína hidrolisada; 287 μ M arginina; 413 μ M cisteína; 13,5 μ M ácido diclorofenoxiacético (2,4-D); 0,8% ágar; pH 5,8; autoclavado a 120°C e 1 atm por 20 minutos. O material vegetal foi mantido à temperatura de 28°C, no escuro, por 30 dias e subcultivado por mais 30-90 dias nas mesmas condições, com transferências para meio fresco mensalmente. Ao logo dessa etapa, isolaram-se calos embriogênicos, isto é, de aspecto compacto, duro e coloração amarelada (HO; VASIL, 1983; TAYLOR et al., 1992). Registros fotográficos foram feitos com câmera digital Cyber-shot DSC-T9 (SONY).

3.8.2 Preparo do alvo

Calos embriogênicos foram subcultivados por 3-7 dias adicionais em MS₁ fresco (MS₃, porém com 4,5 μ M 2,4-D) antes do bombardeamento. Um círculo de aproximadamente 30 mm de diâmetro com 40 calos embriogênicos foi disposto no centro de uma placa de Petri 60 $\times$ 15 mm com meio osmótico (MS₁ adicionado de 0,2 M manitol e 0,2 M sorbitol). O alvo foi mantido nessas condições por 4 h antes do bombardeamento (VAIN, McMULLEN; FINER, 1993).

3.8.3 Biolística

Para testes preliminares foi utilizado o vetor pAHC27 no bombardeamento de calos de cana-de-açúcar. Com o intuito de se obter plantas transgênicas de interesse, no entanto, fez-se cobombardeamento de uma das construções desenvolvidas, pAPAI ou pARPAI, com o vetor pH9. Todos os vetores usados na biolística foram purificados com *HiSpeed Plasmid Midi Kit* (QIAGEN) de acordo com recomendações do fabricante, exceto que o volume utilizado de

cultura bacteriana foi de 100 mL. A quantificação dos plasmídeos foi feita em fluorômetro (item 3.3).

O preparo de micropartículas foi baseado em Rech, Vianna e Aragão (2008) de acordo com a método desenvolvido por Klein et al. (1988). A precipitação foi realizada em uma concentração de 3,33 µg de DNA/mg de micropartículas. Para cada 12 disparos, foram pesados 6 mg de micropartículas de tungstênio (M10, diâmetro aproximado de 1,2 µm; GTE Sylvania) em um tubo de 1,7 mL e adicionados 100 µL de 70% etanol. O tubo foi agitado vigorosamente por 15 min. Transcorrido o tempo, centrifugou-se a 16.000 g por 5 min e o sobrenadante foi removido com auxílio de micropipeta para evitar distúrbio do sedimento. Um volume de 100 µL de água Milli-Q autoclavada foi adicionado ao tubo, sendo conduzida agitação vigorosa e centrifugação como anteriormente. O procedimento foi repetido por mais duas vezes e, após descarte do líquido, o precipitado foi resuspenso em 100 µL de 50% glicerol autoclavado. O tubo foi colocado em banho ultrassônico Branson 220 (Branson) a 50-60 Hz por 5 min, homogeneizado em agitador por 30 s e o volume dividido em duas alíquotas de 50 µL em tubos novos. A cada tubo, foram adicionados 10 µL de 1 µg/µL DNA plasmidial purificado e as partículas agitadas por 2 s; no caso de cobombardeamento com dois plasmídeos, foram utilizados 5 µL de cada um. Em seguida, foram acrescentados 50 µL de 2,5 M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ autoclavado e o tubo agitado por 2 s. Imediatamente, foram adicionados 20 µL de 0,1 M espermidina filtro-esterilizada e agitou-se por 2 s. O tubo foi incubado à temperatura ambiente com agitação lenta por 10 min. Após a precipitação, centrifugou-se a 10.000 g por 5 s e o sobrenadante foi descartado com micropipeta. Foram adicionados 150 µL de 70% etanol e o sedimento foi resuspenso com micropipeta. Centrifugou-se a 10.000 g por 5 s. O sobrenadante foi descartado com micropipeta. O procedimento foi repetido mais uma vez. Com adição 60 µL de etanol absoluto, as partículas foram resuspensas completamente com micropipeta. Sonicou-se a amostra por 3 s em banho-ultrassonicador e, após nova homogeneização com micropipeta, um volume de 8 µL foi distribuído no centro de cada uma das 6 membranas carreadoras Kapton 200HN (24 mm de diâmetro) dispostas sobre suportes metálicos mantidos em sílica até o momento do uso. Todo o aparato utilizado na biolística, como as membranas carreadoras, membranas de ruptura (13,2 mm), telas de retenção de aço inox *mesh* 16 (18 mm de diâmetro) e peças metálicas do equipamento foram esterilizados por pelo menos 5 min em isopropanol e secos em câmara de fluxo laminar.

O acelerador de micropartículas disponível para os experimentos utiliza hélio sob alta pressão (RECH; VIANNA; ARAGÃO, 2008) (Figura 8) e corresponde a uma versão similar ao modelo PDS-1000/He *Biolistic Delivery System* (BIO-RAD) desenvolvido por Sanford et al. (1991). Os parâmetros empregados foram: 25 polHg de pressão de vácuo, 1.200 psi de pressão de hélio, 8 mm de distância entre câmara de alta pressão e membrana carreadora, 13 mm de distância entre membrana carreadora e tela de retenção e 80 mm de distância entre membrana carreadora e alvo. Após o bombardeamento, os calos foram recolocados em MS₁, onde permaneceram por 3 dias no escuro.

Figura 8 – Sistema de aceleração de micropartículas em alta pressão de hélio. A) Detalhe do diagrama da câmara da alta pressão. B) Diagrama geral do aparelho. C) Aparelho utilizado (RECH; VIANNA; ARAGÃO, 2008, modificado)

3.8.4 Ensaio histoquímico de atividade da enzima β -glucuronidase

Em teste preliminar, foi realizado ensaio histoquímico de atividade da β -glucuronidase (GUS) para detectar expressão gênica em calos bombardeados com pACH27. O ensaio histoquímico é um método qualitativo, baseado na clivagem do substrato cromogênico ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurônico (X-gluc) pela enzima GUS, produzindo cor azul (JEFFERSON; KAVANAGH; BEVAN, 1987). O tampão X-gluc é composto por 0,1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ pH 7,0; 10 mM EDTA pH 7,0; 0,5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ pH 7,0; 0,5 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_4] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ pH 7,0; 1,0 mM X-gluc; 0,1% Triton X-100. Após o disparo com o vetor, a placa foi mantida a 27°C, no escuro, por 24 h. Alguns calos foram selecionados aleatoriamente e

colocados em tampão X-gluc, sendo então incubados a 37 °C por 12-16 h. Após isso, os calos foram fixados em 70% etanol e analisados em estereomicroscópio e fotografias registradas.

3.8.5 Seleção, regeneração e aclimatização

Na etapa de seleção, os calos (5 mm de diâmetro aproximado cada) foram distribuídos em MS₁ com 30 mg/L geneticina (G418) filtro-esterilizada em placas de Petri, que foram mantidas na presença de fotoperíodo de 16 h por 15 dias. Houve nova transferência para meio fresco MS₁ com 50 mg/L geneticina, onde permaneceram por mais 15 dias. Para regeneração de plantas, os calos selecionados foram subcultivados em meio MS₀ (MS₃ sem 2,4-D) com 50 mg/L geneticina, nas mesmas condições por 30 dias. Os brotos selecionados foram transferidos para frascos com MS₀ com 50 mg/L geneticina e subcultivados por mais 60-90 dias. Brotos derivados de calos não transformados que foram submetidos às mesmas condições de cultivo *in vitro*, porém sem uso de geneticina, foram empregados como controles. Plântulas com cerca de 10 cm e com raízes desenvolvidas foram transferidas para vasos de 0,25 L com substrato *Plantmax* (Eucatex) umedecido e mantidas por 1 semana em câmara úmida para aclimatização até serem levadas a casa de vegetação com luz natural e irrigação 3 vezes ao dia. Após 1 mês foram acondicionadas em vasos de 5 L, que foram adubados mensalmente com NPK.

3.8.6 Extração de DNA total

De acordo com o protocolo desenvolvido por Doyle e Doyle (1990), um segmento de folha de aproximadamente 100 mg foi coletado e transferido para um tubo, que foi mantido em nitrogênio líquido até o momento do uso. O tecido congelado foi macerado com auxílio de um bastão de vidro e adicionaram-se de 650 µL de tampão de extração [2% CTAB; 1,4 M NaCl; 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 20 mM EDTA pH 8,0; 1% polivinilpirrolidona 40 (PVP-40); 0,2% β-mercaptoetanol; 50 µg/mL proteinase K]. O material foi agitado e incubado a 55°C por 1 h. Foram adicionados 650 µL de solução de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) gelada, agitou-se o tubo e centrifugou-se a 16.000 g por 5 min. A fase superior foi coletada e levada para novo tubo, ao qual foram acrescentados 200 µL de tampão de extração e foram repetidas a agitação e centrifugação. À nova fase superior foram adicionados em novo tubo 650 µL de isopropanol gelado, sendo a mistura incubada a -20°C por 30 min. Após nova centrifugação e descarte do sobrenadante, foram adicionados 500 µL de 70% etanol ao precipitado. Nova centrifugação foi

procedida, porém a 4°C por 20 min. A fase líquida foi descartada e o DNA seco ao ar, resuspenso em 20 µL de TE com 10 µg/mL RNase A e incubado a 37°C por 15 min.

3.8.7 PCR para detecção de transgenes

Para avaliação de transformantes putativos foram realizadas PCRs independentes. Para detecção de *nptII* utilizou-se o par de oligonucleotídeos ‘nptII’ (acesso GU734659) (MIGUEL; OLIVEIRA, 1999), que gera fragmento de 700 pb (Tabela 1). Com intuito de verificar *pai*, optou-se por produzir o oligonucleotídeo ‘pubil’ *sense*, com base na sequência do promotor Ubi1 (acesso S94464) referente ao trabalho de Christensen, Sharrock e Quail (1992) e que está presente nas construções pAPAI e pARPAI, e aplicá-lo em PCR junto ao oligonucleotídeo ‘pai’ *antisense* (Tabela 1), produzindo, respectivamente, fragmentos de tamanho aproximado de 1,4 kb e 1,6 kb.

As reações foram realizadas com 25-50 ng de DNA genômico, 1 U de *Taq* DNA Polymerase recombinant (Fermentas), *Taq* Buffer with KCl 1×, 0,2 mM cada dNTP, 2,0 mM MgCl₂, 0,2 µM cada oligonucleotídeo e água Milli-Q autoclavada para um volume final de 25 µL. As condições utilizadas para o par de oligonucleotídeos ‘nptII’ foram 94°C por 5 min, 94°C por 1 s, 65°C por 1 min, 72°C por 1 min (30 ciclos), 72°C por 5 min em termociclador. Para ‘ubi1 *sense*’ e ‘pai *antisense*’ empregaram-se as mesmas condições que para os pares de oligonucleotídeos ‘pai1’ e ‘pai2’ (item 3.4). Para rec também usadas as condições anteriormente empregadas na construção do vetor pARPAI (item 3.7.3). Em todos os experimentos foram incluídas amostra com 10 ng de pAPAI, pARPAI ou pHA9 (controle positivo), com 25-50 ng de DNA de planta não transformada (controle negativo) e sem DNA molde (controle de reação) e cada análise foi repetida pelo menos uma vez.

3.8.8 Southern blot

Folhas de plantas de 4-7 meses selecionadas em casa de vegetação foram utilizadas para extração de DNA pelo método proposto por Aljanabi, Forget e Dookun (1999). Do tecido macerado em nitrogênio líquido, 1,5 g foi pesado e transferido para um tubo de centrifuga contendo tampão de homogeneização (200 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM EDTA pH 8,0; 2,2 M NaCl; 2% CTAB; 0,06% sulfito de sódio). Ao extrato foram adicionados 1 mL de 5% n-laurilsarcosina; 1 mL de 10% PVP-40 e 1 mL de 20% CTAB. Os tubos foram misturados por

inversão e incubados a 65°C em banho-maria por 1 h, agitando-se ocasionalmente. As amostras foram resfriadas a temperatura ambiente e um volume igual de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) foi adicionado. A amostra foi agitada manualmente e, sem seguida, centrifugada a 10.000 g por 10 min. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e a etapa com clorofórmio:álcool isoamílico foi repetida. Após coleta do sobrenadante, um volume igual de isopropanol gelado foi acrescido, seguido de 1 mL de 5 M NaCl. A mistura foi incubada a -20°C por 1 h e centrifugada como anteriormente. O precipitado foi lavado com 5 mL de etanol 70% e centrifugado. Foram adicionados 1 mL de 70% etanol e o DNA foi transferido para um tubo e novamente centrifugado. A amostra foi seca a temperatura ambiente, resupensa em 100 µL de TE com 10 µg/mL RNase A e incubada a 37°C por 30 min. A amostra foi armazenada a -20°C até o momento do uso.

Para análise de fragmentos de DNA foi utilizada técnica desenvolvida por Southern (1975), conforme modificações propostas por Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989). Cada amostra de 20 µg de DNA genômico foi submetida a uma reação com 60 U de enzima de restrição, tampão adequado, 50 ng/µL BSA, 2,5 mM espermidina e água Milli-Q em um volume de 300 µL em banho-maria a 37 °C por 16 h. Para avaliação de integração do transgene *nptII*, foi utilizada *Bam*HI, pois essa enzima libera de pHA9 o fragmento de 844 pb referente a esse gene. Para análise de número de cópias do transgene *nptII*, cada amostra de DNA genômico foi digerida com *Hind*III, que corta uma única vez pHA9. Paralelamente, digestões independentes foram feitas com *Sac*I para análise de número de cópias do transgene *pai*. Essa enzima de restrição cliva uma única vez pAPAI e pARPAI, fora da sequência *pai*. Também foi feita análise de número de cópias de *pai* em amostras digeridas com *Hind*III, pois essa enzima corta uma única vez pAPAI. Como controle positivo foi utilizado 1 ng de um dos plasmídeos (pHA9, pAPAI ou pARPAI) e como controle negativo, DNA de uma planta não transformada, todos devidamente digeridos.

Após digeridas, todas as amostras foram precipitadas com 30 µL de 5 M NaCl e 2,5 volumes de etanol absoluto a -20°C por 16 h. A centrifugação foi conduzida a 16.000 g por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 600 µL de 70% etanol e centrifugado como anteriormente. As amostras foram secas a 37°C e resuspensas em 30 µL de TE. Às amostras digeridas foi então adicionado tampão de carregamento 1× LB (6× LB: 0,25% azul de bromo-fenol, 30% glicerol em TE) e as mesmas foram submetidas à eletroforese em gel

0,8% agarose em TAE (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA; pH 8,0) com 1,5 mg/L brometo de etídeo por 24 h a 1 V/cm. Como controles foram empregadas amostra digerida de planta não transformada, amostra digerida de uma planta transformada escolhida e amostra de 0,5 ng de plasmídeo digerido. O gel foi depurinado (125 mM HCl) por 10 min, desnaturado (1,5 M NaCl, 500 mM NaOH) por 30 min e neutralizado (1,5 M NaCl, 500 mM Tris-HCl; pH 7,0) por 30 min, sempre com lavagens em água destilada e deionizada depois de cada tratamento. O gel foi invertido e disposto sobre uma ponte de papel filtro umedecida com solução 10× SSC (20× SSC: 0,3 M citrato de sódio, 3 M NaCl; pH 7,0; autoclavada) e em contato com 1 L dessa solução. A transferência para membrana de *nylon* Hybond-N+ (Amersham Biosciences) posicionada sobre o gel foi feita por capilaridade com auxílio de 2 folhas papel filtro Whatman 3MM, 10-15 cm de papéis toalha e peso de 500 g colocado acima de todo o sistema por 16 h. Após esta etapa, a membrana foi seca a 80°C por 1 h e o DNA fixado com tratamento de ultravioleta forno Hoefer UVC 500 UV *Crosslinker* a 70.000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ por duas vezes.

As membranas foram acondicionadas em garrafas de 300 × 35 mm e incubadas com 50 mL de 5× SCC. As sondas para hibridização foram purificadas de gel a partir dos produtos de digestão de pHA9 com *Bam*HI e de pAPAI com *Sac*I e *Kpn*I, liberando *nptII* (844 pb) e *pai* (~1,3 kb) respectivamente. Cento e cinquenta ng de sonda foram marcados com *AlkPhos Direct Labelling* (GE Healthcare), que foi utilizada a 6 ng/mL de tampão de hibridização. As etapas de pré-hibridização, hibridização e lavagens das membranas ocorreram em forno de hibridização (Amersham Life Sciences) de acordo com recomendações do fabricante, porém a temperatura utilizada em todas elas foi de 60°C, exceto a segunda lavagem, que foi feita a temperatura ambiente. Quando conveniente, a membrana foi tratada para remoção da sonda, de acordo com recomendações do *kit* de marcação, e remarcada.

Para detecção de sinal utilizaram-se 40 μL de *CDP-Star Detection Reagent* (GE Healthcare) por cm^2 de membrana, aplicados no escuro. Após secagem, a membrana foi transferida para filme plástico e colocada, no escuro, em contato com chapa fotográfica Hyperfilm (GE Healthcare) dentro de cassete fotográfico Hypercassette (Amersham Life Sciences) por 1-3 h. Após o tempo de exposição, tratou-se a chapa com revelador e reforçador KODAK GBX por 4 min, lavou-se com água, incubou-se em fixador e reforçador KODAK GBX por 10 min e lavou-se com água.

3.8.9 Extração de RNA total

Os procedimentos para extração de RNA foram conduzidos com cadinhos, pistilos e espátulas lavados com 0,01% SDS, enxaguados com água, água destilada e água Milli-Q. Os utensílios foram incubados em água com 0,01% dietilpirocarbonato (DEPC) ativo por 2 h, embalados em papel alumínio, esterilizados em autoclave a 120°C e 1 atm por 20 min e secos em estufa a 80°C. As soluções, exceto clorofórmio:álcool isoamílico, foram preparadas com água contendo 0,01% DEPC inativo (solução autoclavada) e autoclavadas novamente.

A segunda folha expandida de plantas com 3 meses em casa de vegetação foi coletada e armazenada em nitrogênio líquido. Amostra foi macerada e 200 mg foram transferidos para um tubo e adicionados ao mesmo 1 mL de tampão de extração [2% brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB); 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 125 mM EDTA; 2 M NaCl; 2% PVP-40; 0,2% β -mercaptoetanol) pré-aquecido a 55°C (VERICA et al., 2004). A amostra foi agitada vigorosamente por 30 s e incubada em banho-maria a 55°C por 10 min e em gelo por 1 min. Um volume de 1 mL de CIA foi adicionado à amostra, misturou-se por inversão e procedeu-se centrifugação a 16.000 g a 4°C por 10 min. A fase superior foi transferida para um tubo novo e a etapa de tratamento com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) foi repetida mais uma vez. À amostra foi então adicionado 0,3 volume de 8 M LiCl, misturou-se por inversão e o tubo foi mantido a 4°C por 12-16 h. Na próxima etapa, seguiu-se com centrifugação a 16.000 g a 4°C por 30 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 75% etanol por duas vezes, com centrifugações a 16.000 g a 4°C por 10 min. A amostra foi seca ao ar e o precipitado resuspenso em 20 μ L de água com 0,01% DEPC inativo e armazenada a -80°C.

3.8.10 Análise e quantificação de RNA

Uma alíquota de 2 μ L de amostra foi adicionado a 8 μ L de tampão desnaturante [20 mM ácido 3-morfolinopropanosulfônico (MOPS) pH 7,0; 50 mM acetato de sódio; 1 mM EDTA; 17,5% formaldeído; 50% formamida; 0,4 mg/L brometo de etídeo; e 1 $\times$ tampão de carregamento (0,25% azul de bromo-fenol; 0,25% xilenocianol; 0,1 mM EDTA pH 8,0; 50% glicerol)]. A amostra foi previamente aquecida em banho-maria a 55°C por 10 min e transferida para gelo até ser carregada em gel 1,2% agarose em SB preparado com água com 0,01% DEPC inativo submetido a 5 V/cm. A quantificação de RNA foi verificada com 2 μ L de amostra analisada em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

3.8.11 Síntese de cDNA

Para eliminação de DNA, 3 µg de RNA foram submetidos a reação com 1 U de DNase I (Fermentas), 1× *Reaction Buffer with MgCl₂*, 20 U RNaseOUT em água com 0,01% DEPC inativo para 10 µL a 37°C por 30 min. Transcorrido o tempo, foi adicionado 1 µL de 25 mM EDTA e a amostra foi incubada a 65°C por 10 min e colocada em gelo posteriormente. Para testar contaminação das amostras por DNA, usou-se 1 µL (~300 ng) do RNA tratado em PCR com o par de oligonucleotídeos ‘ubi2’ (ALMEIDA, 2007) (Tabela 1), amplificando ~200 pb do gene da poliubiquitina 2 de cana-de-açúcar (acesso TC56667), cuja sequência está disponível em *The Gene Index Project* (http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/resourcerer/plant_search.shtml) em condições similares ao item 3.5.5 e programação em termociclador de 94°C por 3 min, 94°C por 30 s, 60°C por 30 s, 72°C por 30 s (30 ciclos), 72°C por 5 min. As amostras foram aplicadas em gel 1,5% agarose em SB a 3 V/cm (item 3.3).

O RNA descontaminado foi preparado para síntese da primeira fita do cDNA pela adição de 1 µL de 50 mM oligonucleotídeo ‘poli-dT’ (18 pb) ao tubo, que foi incubado a 70°C por 5 min e resfriado a 4°C por 5 min. Para transcrição reversa preparou-se uma reação com 1 µL *ImProm-II Reverse Transcriptase* (Promega), 1× *ImProm-II Reaction Buffer*, 40 U RNaseOUT, 0,2 mM cada dNTP, 3 mM MgCl₂ preparada com água com 0,01% DEPC inativo em um volume de 20 µL. A amostra foi colocada em termociclador a 25°C por 5 min, 42°C por 60 min e 70°C por 15 min. O cDNA foi armazenado a -20°C.

3.8.12 RT-PCR

A confirmação da qualidade do cDNA foi avaliada por transcrição reversa seguida por amplificação (RT-PCR) com o par de oligonucleotídeos ‘ubi2’ (Tabela 1) em condições de acordo com o item 3.8.7. O cDNA foi avaliado para contaminação por DNA genômico por PCR com oligonucleotídeos ‘cis’, do gene cistationina-γ-sintase (acesso TC112757) (Tabela 1), que contém íntron e permite a diferenciação por tamanho de fragmentos amplificados entre cDNA (~200 pb) e DNA genômico. Utilizou-se 1 µL de cDNA por PCR (item 3.8.11) em condições de 94°C por 3 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 s, 56°C por 30 s, 72°C por 30 s (30 ciclos), 72°C por 5 min.

Pares de oligonucleotídeos ‘paiRT’ e ‘recRT’ (Tabela 1) foram sintetizados para análise de cDNAs dos transgenes para amplificação de um fragmento de 200 pb derivado do gene *pai* e

de 123 pb, de *rec*. Para isso, foi utilizada a ferramenta *OligoPerfect Designer*TM (<http://tools.invitrogen.com/content.cfm?pageid=9716>). Parâmetros ótimos de tamanho do oligonucleotídeo de 20 b, temperatura de *melting* de 60°C, %GC de 50% e tamanho do fragmento de 100-200 pb foram escolhidos. Conduziu-se RT-PCR em condição-padrão de reagentes (item 3.8.7) e 1 µL de cDNA sintetizado (item 3.8.10). Em termociclador, os tubos foram submetidos a 94°C por 3 min, 94°C por 30 s, 60°C por 30 s, 72°C por 30 s (30 ciclos), 72°C por 5 min. As amostras foram aplicadas em gel 1,5% agarose em SB a 3 V/cm.

3.8.13 RT-qPCR

Para análise por PCR quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR), foram utilizados pares paiRT e recRT para avaliação dos transgenes alvos e o par de oligonucleotídeos ‘ubi2’ para normalização de expressão. As reações foram preparadas em triplicatas, contendo cada uma delas 1 µL de cDNA diluído a 1:10, 0,4 µM cada oligonucleotídeo, 1× *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix* UDG e água Milli-Q autoclavada em volume total de 10 µL. As amplificações foram realizadas em termociclador Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research) com programação inicial de 50°C por 2 min, 95°C por 2 min e seguidas de 40 ciclos 95°C por 15 s, 60°C por 30 s com detecção de sinal de fluorescência ao final de cada etapa de extensão em valores de ciclo limite de leitura (*Ct*, *cycle threshold*). Após o final da termociclagem, determinaram-se as curvas de dissociação do produto amplificado (curva de *melting*) entre 72°C e 95°C.

A curva padrão de amplificação dos pares de oligonucleotídeos foi estabelecida com um *pool* de amostras de cDNA em diluições seriais a 1:10, 1:50 e 1:100. A aquisição dos dados em tempo real foi efetuada pelo programa *Rotor-Gene Q Series Software*, que forneceu valores de melhor *threshold*, eficiência (*E*) e coeficiente R^2 . Calculou-se a expressão relativa de cada gene alvo de acordo com o método proposto por Pfaffl (2001).

3.8.14 Western blot

As proteínas totais de folhas de plantas com 4-7 meses foram extraídas. A 300 mg de tecido macerado em nitrogênio líquido, adicionaram-se 600 µL de tampão de extração (100 mM K_2HPO_4 pH 7,5; 3 mM DTT; 4% PVP-40). As amostras foram centrifugadas a 16.000 g por 15 min a 4°C por duas vezes para eliminação do precipitado e armazenadas a -20°C. A quantificação foi realizada como no item 3.6.6 com os extratos diluídos 4 vezes.

As etapas descritas a seguir foram realizadas no Laboratório de Genética Bioquímica da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), USP, Piracicaba, SP. Por meio de SDS-PAGE 10% acrilamida (item 3.6.4), foram analisados 25 µg de proteínas de cana-de-açúcar. Como controle negativo foi aplicado no gel a mesma quantidade de proteínas de uma planta não transformada e como controle positivo, 30 ng da proteína PAI produzida em *E. coli* e purificada (item 3.6.5). Utilizou-se marcador C-3312 *Color Markers for SDS-PAGE and Protein Transfer* (SIGMA).

A técnica de *Western blot* foi realizada com transferência semisseca (TOWBIN; STAEBELIN; GODON, 1979). Primeiramente, o gel e uma membrana de nitrocelulose 0,45 µm PROTRAM Whatman cortada nas dimensões do gel foram equilibrados em tampão de transferência (25 mM Tris-base; 192 mM glicina; 20% metanol) por 15 min. Um sistema com papel de filtro umedecido (BIO-RAD) em tampão de transferência, sobreposto por gel, membrana e outra folha de papel de filtro umedecido foi montado e a transferência das proteínas foi realizada a 75 mA por 12 min, 175 mA por 15 min, 400 mA por 25 min e 450 mA por 10 min, sequencialmente, em equipamento *Trans blot SD semi-dry transfer cell* (BIO-RAD). A membrana foi tratada com tampão PBS (0,14 M NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,7 mM KH₂PO₄; pH 7,4) por 5 min com agitação. Para bloqueio de ligações inespecíficas, a membrana foi colocada em contato com tampão TBS (20 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; pH 7,6) com 0,2% Tween 20 e 5% leite em pó desnatado por 30 min com agitação e lavada por 3 vezes de 10 min cada em TBS-T (TBS com 1% Tween 20). A membrana foi incubada por 1 h com anticorpo primário PAI a 1:1000 em TBS-T (0,1 mL/cm²) com agitação e lavada por 3 vezes de 10 min cada em TBS-T. O anticorpo primário é derivado do antissoro de coelhos imunizados com PAI purificada (HORNUNG et al., 2005), tendo sido fornecido por Ellen Hornung (Georg-August-Universität, Göttingen, Germany). Em seguida, procedeu-se incubação da membrana por 1 h com anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina [*anti-rabbit IgG (whole molecule), alkaline phosphatase conjugate, developed in goat*, SIGMA) a 1:5000 em TBS-T com agitação e lavou-se brevemente em PBS. Para detecção, a membrana seca ao ar foi revelada em 10 mL de PBS com 66 µL de 50 mg/mL cloreto de tetrazólio nitro-azul (NBT) e 33 µL de 50 mg/mL 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP) dissolvidos em 70% e 50% de dimetilformamida, respectivamente, até as bandas se tornarem visíveis.

3.8.15 Extração, metilação e análise de ácidos graxos de cana-de-açúcar

Os ácidos graxos foram extraídos, metilados e analisados no Laboratório de Nutrição e Crescimento Animal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), USP, Piracicaba, SP. Para análise de ácidos graxos, folhas jovens de plantas com 6-8 meses foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido. Em seguida, as amostras foram trituradas em moedor elétrico na presença de gelo seco, maceradas em cadinho com nitrogênio líquido e liofilizadas por pelo menos 72 h. Para um tubo de 10 × 14 cm foram transferidos 200 mg de amostra e adicionados 4 mL de solução de metanol:cloroeto de acetila (20:1). Acrescentaram-se 2 mL de hexano absoluto e os frascos foram cuidadosamente fechados e incubados em banho-maria a 90°C por 10 min. Após voltarem à temperatura ambiente, 4 mL de água destilada foram adicionados e centrifugou-se a 3.300 g por 5 min. Com auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro, o sobrenadante foi coletado e transferido para um tubo de cromatografia, que foi armazenado a -20°C.

As amostras metiladas foram analisadas em cromatógrafo a gás Focus CG-Finnigan com detector de ionização de chama, coluna capilar CP-Sil 88 (Varian) com 100 m de comprimento por 0,25 mm de diâmetro interno e 0,20 mm de espessura do filme. Hidrogênio foi utilizado como gás de arraste em vazão de 1,8 mL/min. O programa de temperatura inicial do forno foi de 70°C com tempo de espera de 4 min, seguido de aumento até 175°C (13°C/min) com tempo de espera de 27 min, elevação a 215°C (4°C/min) com tempo de espera de 9 min e, em seguida, aumentando até 230°C (7°C/min) e permanecendo 5 min, em um total de 65 min. A temperatura do vaporizador foi de 250°C e do detector, de 300°C. Uma alíquota de 1 µL do extrato esterificado foi injetado no cromatógrafo e a identificação dos ácidos graxos foi feita pela comparação dos tempos de retenção e as porcentagens em massa obtidas com o programa Chromquest 4.1 (Thermo Electron).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Clonagem do gene da isomerase do ácido linoleico de *Propionibacterium acnes*

O gene da isomerase do ácido linoleico de *P. acnes* (*pai*) foi inicialmente clonado para confirmação de identidade e para posterior subclonagem em construção para expressão heteróloga. Para tanto, oligonucleotídeos específicos ‘*pai*1’ foram produzidos para se amplificar o gene *pai* completo a partir de DNA extraído de células cultivadas de *P. acnes*. Um fragmento de tamanho aproximado de 1,3 kb, conforme o esperado, foi obtido (Figura 9A), purificado e primeiramente ligado em pGEM-T *Easy*. O vetor gerado, denominado pGPAI, foi introduzido em *E. coli* TOP10 ou DH10B e teve sua sequência *pai* confirmada por amplificação nas colônias 3 e 10 (pGPAI-3 e pGPAI-10) (Figura 9B) e por restrição enzimática com *Eco*RI para o clone pGPAI-3, liberando um fragmento de 1,3 kb (Figura 9C).

Figura 9 – Isolamento de *pai* e confirmação de clonagem em pGEM-T *Easy* para gerar pGPAI. A) PCR de DNA genômico de *P. acnes*. Fragmento *pai* de 1,3 kb (P, seta). B) PCR de DNA plasmidial de *E. coli*. Fragmento *pai* de 1,3 kb (3 e 10, seta). Controle negativo de reação (N). C) Restrição de DNA plasmidial pGPAI-3 com *Eco*RI. Fragmento *pai* de 1,3 kb liberado (3, seta). Marcador λ DNA/*Hind*III (Invitrogen) (M). Fragmento de 1,3 kb (seta). Géis 0,8% agarose

O sequenciamento das construções pGPAI-10 e pGPAI-3 empregando os oligonucleotídeos ‘T7’ e ‘SP6’ e alinhamento do *contig* em ClustalW confirmou a presença de *pai* (Apêndice A), que possui 1275 pb (HORNUNG et al., 2005; DENG et al., 2007). BLASTn revelou identidade de 96% com o acesso AE017283.1 do genoma completo de *P. acnes* KPA171202, na região que corresponde à sequência *linoleate isomerase* (AX062088) (não mostrado).

4.2 Construção de vetor para expressão heteróloga em *Escherichia coli*

Para avaliar a expressão da enzima PAI em sistema heterólogo, o plasmídeo pGPAI-3 foi submetido a restrição enzimática com *NdeI* e *XhoI*, e a banda correspondente ao fragmento *pai* foi isolada em gel e subclonada em pET-28a produzindo-se o plasmídeo pEPAI. Essa construção foi introduzida inicialmente em *E. coli* TOP10 ou DH10B.

As colônias possivelmente transformantes contendo pEPAI foram submetidas à extração de DNA plasmidial, que foi empregado em PCR, revelando colônias transformantes (Figura 10A). Além disso, a amostra do clone pEPAI-10 foi digerida com *XbaI* e *XhoI* para liberação do inserto *pai* (Figura 10B) e a subclonagem também foi corroborada por sequenciamento empregando oligonucleotídeo 'T7' nos clones pEPAI-2 a 4 e 6 a 10 (Figura 11).

Figura 10 – Confirmação de clonagem em pET-28a para gerar pEPAI. A) PCR de DNA plasmidial de *E. coli*. Fragmento *pai* de 1,3 kb (2-4 e 6-12, seta). Controle negativo (N). B) Restrição de DNA plasmidial pEPAI-10 com *XbaI* e *XhoI*. Fragmento *pai* de 1,3 kb liberado (10, seta). C) PCR de colônia de *E. coli* BL21-*CodonPlus*. Fragmento *pai* de 1,3 kb de pEPAI-10 (10, seta), controle negativo de reação (N), controle negativo de *E. coli* com vetor pET-28a vazio (N'). λ DNA/*HindIII* (GIBCO) (M) em A e B e Φ X174 RF DNA/*HaeIII* (GIBCO) (M) em C. Fragmento de 1,3 kb (seta). Géis 0,8% agarose

Uma vez confirmada a subclonagem de *pai*, a construção pEPAI-10 foi empregada na transformação de cepas de *E. coli* BL21 (DE3) e BL21-*CodonPlus*. Controles negativos com cepas transformadas com o vetor pET-28a vazio foram utilizados para análise. Das colônias transformadas, selecionadas e inoculadas em meio líquido com antibiótico canamicina, procedeu-se confirmação por PCR de colônia com oligonucleotídeos 'pai1' anteriormente à indução de expressão (Figura 10C).

```

>lcl|13403
Length=1275

Score = 1029 bits (557), Expect = 0.0
Identities = 605/628 (96%), Gaps = 9/628 (1%)
Strand=Plus/Plus

Query 129 ATGTCCATCTCGAAGGATTCAGTATCGCCATCATCGGTGCTGGCCCGGCCGGCTGGCT 188
          |||
Sbjct 1 ATGTCCATCTCGAAGGATTCAGTATCGCCATCATCGGGCTGGCCCGGCCGGCTGGCT 60

Query 189 GCCGGAATGTACCTCGAACAGGCCGGATTTACGACTACACAATCCTGGAACGCACCGAC 248
          |||
Sbjct 61 GCCGGAATGTACCTCGAACAGGCCGGATTTACGACTACACGATCCTGGAACGCACCGAC 120

Query 249 CACGTCGGAGGCAAGTGCCACTACCGAACTACACGGCCGTCGTTATGAGATGGGAGCC 308
          |||
Sbjct 121 CACGTCGGAGGCAAGTGCCACTACCGAACTACACGGCCGTCGTTATGAGATGGGGGCC 180

Query 309 ATCATGGGCGTCCCCAGTACGACACCACTC-AGGAGATCATGAATCGACCGGCGACAA 367
          |||
Sbjct 181 ATCATGGGCGTCCCCAGTTACGACACCA-TCCAGGAGATCATGGATCGCACTGGCGACAA 239

Query 368 GGTCGACGGGCCGAACTGCGTCGCGAGTTCTGCACGAGGACGGCGAGATCTACGTCCC 427
          |||
Sbjct 240 GGTCGACGGGCCGAACTGCGTCGCGAGTTCTGCACGAGGACGGCGAGATCTACGTCCC 299

Query 428 GGAAAAGGATCC-GATGCGTGGCCCGCAGGTTATGGCAGCAGTGCAGAAGCTGGGTCAGT 486
          |||
Sbjct 300 GGAAAAGGATCCAG-TGCGTGGTCCGCGAGTTCATGGCAGCAGTGCAGAAGCTGGGCCAGT 358

Query 487 TGCTCGCGACGAAGTACCAAGGATATGACGCCAACGGCCACTACAACAAGGTTACAGAG 546
          |||
Sbjct 359 TGCTCGCGACGAAGTACCAG-GGATATGACGCCAACGGCCACTACAACAAGGTTACAGAG 417

Query 547 GACCTCATGCTGCCCTTCGACGAGTTCTCGCCCTCAACGGGTGCGAGGCCGCCGAGAC 606
          |||
Sbjct 418 GACCTCATGCTGCCCTTCGACGAGTTCTCGCCCTCAACGGGTGCGAGGCCGCCGAGAC 477

Query 607 CTGTGGATCAACCCCTTCACGGCCTTCGGCTACGGGCACCTTCGACAACGTCCCGGCCGCC 666
          |||
Sbjct 478 CTGTGGATCAACCCCTTCACGGCCTTCGGCTACGGGCACCTTCGACAACGTCCCGGCCGCC 537

Query 667 TACGTGCTGAAGTACCTCGACTTCGTACCATGATGTCNIT-GCCAAGGGAGAT-INTTG 724
          |||
Sbjct 538 TACGTGCTGAAGTACCTCGACTTCGTACCATGATGTCCTTTGCCAAGGGAGATCTGTGG 597

Query 725 ACGTGGGCCGACGGCNC-AG-CGATGT 750
          |||
Sbjct 598 ACGTGGGCCGACGGCACCCAGGCGATGT 625

```

Figura 11 – Análise por BLASTn entre sequência obtida com oligonucleotídeo ‘T7’ para pEPAI-10 e sequência AX062088. Notar elevada identidade (96%)

4.3 Expressão heteróloga da proteína PAI em *Escherichia coli*

A bactéria *E. coli* é frequentemente utilizada para expressão de proteínas por conta de fatores como simplicidade, baixo custo, crescimento rápido, genética bem conhecida e grande número de ferramentas biotecnológicas disponíveis (SØRENSEN; MORTENSEN, 2005). Com o intuito de caracterizar PAI, as linhagens de *E. coli* BL21 (DE3) e BL21-*CodonPlus* transformantes para pEPAI-10 foram induzidas a expressão visando ao acúmulo dessa proteína. Na análise por SDS-PAGE da fração insolúvel do extrato celular obtido de ambas as cepas, a presença de uma banda inequívoca de aproximadamente 50 kDa sugeriu a expressão da proteína heteróloga PAI, progressivamente evidente com o decorrer do tempo de indução (Figura 12A). Por outro lado, na fração solúvel do extrato proteico, nenhuma proteína diferencialmente expressa foi visualizada (Figura 12B). Também não foram detectadas diferenças evidentes

quando foram comparados os perfis proteicos dos géis produzidos de *E. coli* BL21 (DE3) e BL21-*CodonPlus*.

Figura 12 – Frações do extrato proteico de *E. coli* BL21 (DE3). A) Fração insolúvel do extrato proteico. B) Fração solúvel do extrato proteico. *BenchMark protein ladder* (Invitrogen) (M). Controle negativo pET28a (N). Cepa pEPAI-10 (PAI). Números indicam o tempo em horas em relação à indução com 1 mM IPTG. Géis 12,5% (A) e 10% (B) poliacrilamida. Proteína PAI de 50 kDa (seta)

O tamanho da proteína observada na fração insolúvel do extrato proteico foi congruente com o relatado por Deng et al. (2007), que realizaram um minucioso estudo bioquímico sobre a isomerase do ácido linoleico de *P. acnes*, citada como LAI por esses autores. PAI, assim referida por outros e no presente trabalho, é uma proteína relativamente pequena e possui 424 resíduos de aminoácidos (LIAVONCHANKA et al., 2006). Tem peso molecular predito de 50 kDa, mas na proteína nativa purificada de *P. acnes*, a metionina N-terminal foi excluída em razão de uma reação enzimática presumível e o peso molecular relatado é de 48 kDa (DENG et al., 2007).

A proteína diferencialmente expressa foi subsequentemente isolada do gel por eletroeluição, dialisada, submetida a sequenciamento após quantificação, que assegurou sua identidade PAI (não mostrado). Do ponto de vista funcional, por BLASTp é possível sugerir que

PAI é uma amino-oxidase putativa, o que é coerente com informação inicial sobre o sequenciamento do genoma de *P. acnes* (BRÜGGEMANN et al., 2004).

Embora tenha sido detectada apenas na fração insolúvel de *E. coli* nos experimentos realizados neste trabalho, PAI é uma proteína solúvel (LIAVONCHANKA et al., 2006). Essa situação pode ser explicada pelo sequestro da proteína recombinante em corpos de inclusão, como ocorre com a grande maioria da proteína recombinante PAI quando é expressa em sistema procariótico (DENG et al., 2007).

Novos testes foram realizados com a cepa BL21-*CodonPlus* com concentrações menores de IPTG, tais como 0,3 mM e 0,5 mM, temperatura de indução inferior (20°C) e coletas de 12-16 h afim se obter quantidade de proteína na forma solúvel. Apesar de todas as modificações, a proteína de interesse mostrou-se aparente apenas na fração insolúvel do extrato proteico de *E. coli*.

4.4 Avaliação do perfil de ácidos graxos em *Escherichia coli* transformada

As cepas de *E. coli* BL21 (DE3) com a construção pEPAI-10 e com pET-28a vazio (controle negativo) foram cultivadas com 0,3 mM IPTG a 20°C por 12-16 h e os ácidos graxos foram extraídos a partir de amostras do lisado celular separado de acordo com as frações insolúvel e solúvel como anteriormente. As amostras foram derivatizadas e submetidas à análise de Cromatografia Gasosa (Tabela 2).

Pela análise dos cromatogramas gerados, não se verificaram diferenças qualitativas de ácidos graxos quando foram comparados os dois tipos de cepas transformadas e não foi detectado CLA. A não funcionalidade de PAI muito provavelmente está associado com seu aglomeramento em corpos de inclusão (HORNUNG et al., 2005; DENG et al., 2007). Mesmo que uma pequena parte da proteína recombinante possa ocorrer na forma solúvel, existe outro fator limitante intrínseco, já que esta aceitaria apenas ácidos graxos não esterificados como substratos (HORNUNG et al., 2005). Sendo assim, é possível que uma quantidade insuficiente do substrato ácido linoleico disponível na forma de ácido graxo livre nas linhagens de *E. coli* possa ter conduzido a não produção de *l*10,*c*9-CLA ou pelo menos não em quantidade suficientemente detectável pelo método utilizado. Quando o extrato celular de *E. coli* recombinante foi incluído por Hornung et al. (2005) e Deng et al. (2007) em análise de atividade com presença de substrato ácido linoleico, CLA foi produzido, representado exclusivamente pelo isômero *l*10,*c*9-CLA.

t10,c9-CLA é o único isômero produzido por PAI a partir de ácido linoleico, ainda que outros substratos possam ser utilizados, uma vez que LA é substrato preferido, mas não único e PAI é considerada uma enzima promíscua. PUFA's de cadeia longa podem ser aceitos como substrato, sendo possível a formação de trienos conjugados a partir de ácido linolênico, ácido araquidônico e ácido docosaexaenoico (HORNUNG et al., 2005).

Tabela 2 – Análise de ácidos graxos de *E. coli* BL21-*CodonPlus*

Ácido graxo	pET-28a		pEPAI	
	Fração insolúvel	Fração solúvel	Fração insolúvel	Fração solúvel
16:0	22,8	18,6	23,69	18,79
16:1 ^{Δ9Z}	1,5	1,4	3,7	3,5
18:0	11,1	11,3	10,1	10,1
18:1 ^{Δ9Z}	25,4	27,2	27,3	20,6
18:2 ^{Δ9Z,12Z}	27,2	30,4	25,5	19,6
18:2 ^{Δ10E,12Z} (<i>t10,c12</i> -CLA)	nd	nd	nd	nd
18:3 ^{Δ9Z,12Z,15Z}	1,0	-	1,4	-
Outros	11,2	11,2	8,5	27,5

Os valores estão representados em massa (%) de ácidos graxos totais. Não detectado (nd).

Realizando detalhado estudo sobre PAI, Deng et al. (2007) omitiram o códon de terminação do gene que foi clonado em vetor pET-24a, de modo a permitir a inclusão de cauda de His na região C-terminal da proteína codificada. No entanto, PAI modificada e marcada com His mostrou redução de solubilidade e atividade em dez vezes. Quando parâmetros de fermentação e composição de meio de cultura foram otimizados, entretanto, o nível de atividade da isomerase aumentou em até 376 vezes (DENG et al., 2007).

Com a otimização da produção de PAI em *E. coli*, o sistema procariótico se tornaria uma interessante alternativa biotecnológica para produção de CLA. Em geral, o CLA usado em pesquisas é produzido por métodos químicos que esbarram no alto custo e na impureza dos produtos (SÆBØ, 2003). Se grandes quantidades de proteína recombinante podem ser produzidas em *E. coli*, a purificação desta enzima e o emprego dela em ensaios de atividade com ácido linoleico podem levar a produção do isômero *t10,c12*-CLA puro. Além disso, genes correlatos de outros microrganismos oferecem a possibilidade de se produzir *c9,t11*-CLA, outro isômero de

grande interesse em pesquisas (LIAVONCHANKA; FEUSSNER, 2008). A transferência dessa tecnologia para sistemas eucarióticos é outra realidade. Até a o presente, levedura e organismos mais complexos como plantas de tabaco e arroz foram geneticamente transformados para conversão de ácido linoleico em *t*10,*c*12-CLA (HORNUNG et al., 2005; KOHNO-MURASE et al., 2006).

4.5 Construção de vetores para transformação genética de cana-de-açúcar

Para transformação de cana-de-açúcar, foram inicialmente planejadas duas construções baseadas no vetor pAHC17L1 (CAMARGO, 2007), que representa uma versão modificada de pAHC17 (CHRISTENSEN; QUAIL, 1996). Esse vetor contém o promotor do gene da ubiquitina-1 de milho (CHRISTENSEN; SHARROCK; QUAIL, 1992) e possibilita expressão gênica forte e constitutiva em monocotiledôneas, inclusive em cana-de-açúcar (GALLO-MEAGHER; IRVINE, 1993). Por esse motivo, os vetores da série pAHC e seus derivativos têm sido utilizados em diversos trabalhos de transformação genética de cana-de-açúcar (INGELBRECHT; IRVINE; MIRKOV, 1999; FALCO; TULMANN NETO; ULIAN, 2000; FALCO; SILVA-FILHO, 2003; McQUALTER et al., 2004; McQUALTER et al., 2005; CHONG et al., 2007; JAIN et al., 2007; PETRASOVITS et al., 2007; RIBEIRO et al., 2008; MELOTTO-PASSARIN, 2009; OSABE et al., 2009).

4.5.1 pAPAI

Novos oligonucleotídeos, denominados ‘pai2’, foram desenhados de maneira semelhante aos oligonucleotídeos ‘pai1’, porém com sítios de restrição específicos para clonagem direcional do gene *pai* em pAHC17L1 (Figura 13A). O fragmento *pai* foi amplificado do DNA genômico de *P. acnes*, purificado e ligado em pGEM-T *Easy*, gerando-se pGPAI2. A clonagem foi confirmada por amplificação nos clones pGPAI2-2 e pGPAI2-4 (não mostrado) e por restrição enzimática do plasmídeo do clone pGPAI2-2 com *Sac*I e *Kpn*I (Figura 13B).

Figura 13 – Isolamento de *pai* e confirmação de clonagem em pGEM-T *Easy* para gerar pGPAI2. A) PCR de DNA genômico de *P. acnes*. Fragmento *pai* de 1,3 kb (P, seta). Controle negativo de reação (N). λ DNA/*Hind*III (GIBCO) (M) ΦX174 RF DNA/*Hae*III (GIBCO) (M). B) Restrição de DNA plasmidial pGPAI2-2 com *Sac*I e *Kpn*I. Fragmento *pai* de 1,3 kb liberado (2, seta). Fragmento de 1,3 kb (seta). 100 bp (AMRESCO) (M). Géis 0,8% agarose

O fragmento *pai* liberado de pGPAI2-2 foi isolado em gel, purificado e subclonado em pAHC17L1 previamente digerido. As confirmações da subclonagem nos clones pAPAI-5 e pAPAI-9 se deram por PCR (não mostrado) e por nova restrição enzimática com *Hind*III e *Eco*RI pela produção de 3 fragmentos (~1,4 kb, 2,2 kb e 2,6 kb), e com *Sac*I e *Kpn*I, que excisa *pai* (~1,3 kb) do restante da construção (~4,9 kb) (Figura 14). Adicionalmente, o sequenciamento empregando oligonucleotídeo ‘pai2’ comprovou a identidade de *pai* em ambos (Figura 15).

Figura 14 – Restrição enzimática de vetores utilizados na transformação genética de cana-de-açúcar. *GeneRuler* 1 Kb DNA Ladder (Fermentas) (M). *Bam*HI (B). *Eco*RI (E). *Hind*III (H). *Kpn*I (K). *Sac*I (S). Fragmento *pai* de 1,3 kb (seta). Gel 0,8% agarose

```
>[emb]AX062088.1| Sequence 60 from Patent WO0100846
Length=1275

Score = 582 bits (315), Expect = 4e-170
Identities = 389/424 (91%), Gaps = 15/424 (3%)
Strand=Plus/Plus

Query 12  ATCGCCATCATCGGTCCTCGGCCCTANCCGGGCTGGCTGCCGGAATGTACCTCGAACAG 71
          |||||
Sbjct 25  ATCGCCATCATCGG-GGCT-GGCCG-GGCCGGGCTGGCTGCCGGAATGTACCTCGAACAG 81

Query 72  GCCGGATTTCACGACTACAGATCCTGGAACGCACCGACCACGTCGGAGGCAAGTGCCAC 131
          |||||
Sbjct 82  GCCGGATTTCACGACTACAGATCCTGGAACGCACCGACCACGTCGGAGGCAAGTGCCAC 141

Query 132  TCACCGAACTACACGGCCGTCGTTATGAGATGGGAGCCATCATGGGCGTCCCCAGCTAC 191
          |||||
Sbjct 142  TCACCGAACTACACGGCCGTCGTTATGAGATGGGAGCCATCATGGGCGTCCCCAGTTAC 201

Query 192  GACACCACTC-AGGAGATCATGAATCGCACCGGCGACAAGGTCGACGGGCGGAGACTGCG 250
          |||||
Sbjct 202  GACACCA-TCCAGGAGATCATGGATCGCACTGGCGACAAGGTCGACGGGCGGAACTGCG 260

Query 251  TCGCGAGTTCCTGCACGAGGACGGCGAGATCTACGTCCCNITNAAAGGATCC-GATGCGT 309
          |||||
Sbjct 261  TCGCGAGTTCCTGCACGAGGACGGCGAGATCTACGTCCCGGA-AAAGGATCCAG-TGCGT 318

Query 310  GGCCCGCAAGTATGGCAGCAGTGCAGANGCTGGGTTTCAGTTGCTCGCGACGAAGGTACC 369
          |||||
Sbjct 319  GGTCGCGAGGTCATGGCAGCAGTGCAGAAGCTGGGC-CAGTTGCTCGCGACGAAG-TACC 376

Query 370  NGGGNATATTGACGCCAATGTGCCACTACGAGAAGGTTACGAGGACCTCATGGCTGTCC 429
          |||||
Sbjct 377  AGGG-ATAT-GACGCCAAG-GCCACTACAACAAGGTTACGAGGACCTCATG-CTG-CC 431

Query 430  CTTC 433
          ||||
Sbjct 432  CTTC 435
```

Figura 15 – Análise por BLASTn entre sequência obtida com oligonucleotídeo ‘T7’ para pAPAI-5 e sequência AX062088. Notar elevada identidade (91%)

4.5.2 pARPAI

Os plastídeos são organelas que realizam inúmeras reações metabólicas, sendo centrais na síntese de ácidos graxos (BROWSER; SOMERVILLE, 1991; OHLROGGE; JAWORSKI, 1997). Algumas proteínas codificadas no núcleo são sintetizadas no citoplasma como precursores com peptídeos de trânsito que as enviam para a dupla membrana do envelope do cloroplasto e através dela (CLINE; HENRY, 1996). Tendo isso em vista, isolou-se parte do gene da proteína de reparo de DNA de *A. thaliana* (*recA*) para endereçamento da isomerase do ácido linoleico PAI a cloroplasto. Estudos com linhagens transgênicas para o vetor RecA-GFP, que contém parte da sequência do gene *recA* fusionada com *gfp*, indicam que este peptídeo de trânsito direciona GFP para o estroma do plastídeo em tabaco e petúnia (KÖHLER et al., 1997). Embora esse peptídeo de trânsito não tenha sido avaliado em cana-de-açúcar, em células de epitélio de cebola GFP também mostrou localização plastidial (SANTOS, 2008).

A sequência sinal chamada de *rec* e a região codificadora do gene *pai* foram previamente estudadas para serem ligadas no mesmo quadro de leitura para o desenvolvimento da construção pARPAI (Figura 16). Oligonucleotídeos ‘rec’ foram empregados para amplificação com base no vetor RecA-GFP. As condições de PCR a partir do plasmídeo RecA-GFP foram estabelecidas e, de acordo com o esperado, a eletroforese revelou um fragmento de 204 pb (Figura 17A).

```

1 atggattcacagtagtcttctgaagctgaatccaagcttc
  M D S Q L V L S L K L N P S F
46 actcctcttctctctcttcccttccatgttcttcttctt
  T P L S P L F P F T P C S S F
91 tcgcgctgcctcgggtttcttctgctactccgcgcctctat
  S P S L R F S S C Y S R R L Y
136 tctccgggttacccgtctacgcgcgaagaaactctccacaaatc
  S P V T V Y A A K K L S H K I
181 agttctgaattcgatgacagaaaagagctcatgtccatctcgaag
  S S E F D D R K E L M S I S K
226 gattcacgtatcgccatcatcggggctggccggcggtgggt
  D S R I A I I G A G P A G L A
271 gccggaatgtacctgaacaggccggttccacgactacacgac
  A G M Y L E Q A G F H D Y T I
316 ctggaacgcaccgaccacgtcggaggcaagtgcactcaccgaac
  L E R T D H V G G K C H S P N
361 taccacggccgctgttatgagatggggcccatcgtggcgtcccc
  Y H G R R Y E M G A I M G V P
406 agttacgacaccatccaggagatcatggatcgactggcgacaag
  S Y D T I Q E I M D R T G D K
451 gtcgacgggcccgaactgcgtcgcgagttcctgcacgaggcggc
  V D G P K L R R E F L H E D G
496 gagatctacgtcccggaagagatccagtgctggtccgcaggtc
  E I Y V P E K D P V R G P Q V
541 atggcagcagtgagaaagtgggcccagttgctcgcgacgaagtac
  M A A V Q K L G Q L L A T K Y
586 cagggatatgacgccaacggccactacaacaggttcacgaggac
  Q G Y D A N G H Y N K V H E D
631 ctcattgctgcccttcgacgagttcctcgccctcaacgggtgcgag
  L M L P F D E F L A L N G C E
676 gccgcccagagactgttgatcaaccccttcacggccttcggctac
  A A R D L W I N P F T A F G Y
721 gggcacttcgacaaactcccgccgctacgtgtgaagtacctc

766 gacttcgctaccatgatgtcctttgccaggagatctgtggacg
  D F V T M M S F A K G D L W T
811 tgggcccagggcaccaggcgatgttcgagcacctcaacggcacc
  W A D G T Q A M F E H L N A T
856 ctggagcacccggccgaacgcaacgttgacatcactcgcacacc
  L E H P A E R N V D I T R I T
901 cgcgaggacggcaaggtccacattcacaccacggactgggatcgc
  R E D G K V H I H T T D W D R
946 gagtccgacgtcctcgtcctcaccgtcccgctggaaaagtctctc
  E S D V L V L T V P L E K F L
991 gactactccgacgcggacgatgacgagcgggagttctcgaag
  D Y S D A D D D E R E Y F S K
1036 atcatccaccagcagtagatgggtggtgctgctgggtgaaggag
  I I H Q Q Y M V D A C L V K E
1081 tacccgacatctccgggtacgtcccgacacatgaggcccgaa
  Y P T I S G Y V P D N M R P E
1126 cgtctcgggcacgtcatgtttactaccacgctgggctgatgat
  R L G H V M V Y Y H R W A D D
1171 ccgaccagatcatcagcacctacgtgctacgtaaccatccggac
  P H Q I I T T Y L L R N H P D
1216 tacgcccgaagactcaggaggagtgccgcagatggtcctcgac
  Y A D K T Q E E C R Q M V L D
1261 gacatggagaccttcgggtcatccggtcgagaagatcatcgaggag
  D M E T F G H P V E K I I E E
1306 cagacctgggtactacttcccgacggttagctcggaggactacaag
  Q T W Y Y F P H V S S E D Y K
1351 gccgggtggtacgagaaggtcgagggaatgcagggtcgtcgcaac
  A G W Y E K V E G M Q G R R N
1396 accttctacgcccggagaaattatgagtttcggttaatttcgacgag
  T F Y A G E I M S F G N F D E
1441 gtgtgccactactcgaaggacctggtgacgcggttcttcgtgtga
  V C H Y S K D L V T R F F V *
1485

```

Figura 16 – Sequência *rec-pai* analisada com a ferramenta ORF *Finder*. Os primeiros 204 nucleotídeos referem-se à sequência *rec* (1-204), que segue com o sítio de restrição *SacI* (GAGCTC, sublinhado, 205-210) e com os 1275 nucleotídeos de *pai* (211-1485) no mesmo marco de leitura.

Inicialmente, o fragmento *rec* foi clonado em pGEM-T *Easy*. As colônias transformantes foram confirmadas por PCR de DNA plasmidial (não mostrado) e por restrição com *Bam*HI e *Sac*I (Figura 17B). O sequenciamento confirmou identidade nos clones 1, 2 e 5 (Figura 18). Por conta da existência de um sítio *Bam*HI interno em *pai*, foi adotada a estratégia de primeiro clonar *rec* no vetor pACH17L1 para produzir um vetor intermediário, antes da inclusão de *pai* no mesmo quadro de leitura. Para isso, o fragmento *rec* foi liberado de pGEM-T *Easy* com *Bam*HI e *Sac*I e as mesmas enzimas foram utilizadas para digerir o vetor pAHC17L1, que recebeu primeiramente *rec*, construindo o vetor denominado aqui de pAR. O sequenciamento confirmou o clone pAR-12 com oligonucleotídeo ‘rec’ (não mostrado). A sequência *pai* foi então reamplificada, digerida com *Sac*I e *Kpn*I e ligada ao vetor pAR, gerando pARPAI. Os plasmídeos dos clones pARPAI de 1-12 foram confirmados por amplificação usando os oligonucleotídeos ‘pai2’ (não mostrado).

Figura 17 – Isolamento de *rec* e confirmação de clonagem em pGEM-T *Easy* para gerar pGR. A) PCR de DNA plasmidial RecA-GFP. Fragmento de 204 pb (R, seta). Controle negativo (N). Gel 1,5% agarose. Controle negativo de reação (N). B) Restrição de DNA plasmidial pGR-2 com *Bam*HI e *Sac*I. Fragmento *rec* de 204 pb liberado (2, seta). Gel 2% agarose. O *GeneRuler* 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas) (M)

```
>[ref|NM_106556.2|] UEG Arabidopsis thaliana DNA repair protein recA (AT1G79050) mRNA,
complete cds
Length=1482

GENE ID: 844246 AT1G79050 | DNA repair protein recA [Arabidopsis thaliana]

Score = 368 bits (199), Expect = 1e-105
Identities = 202/203 (99%), Gaps = 1/203 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 91 ATGGATTACAGCTAGTCTTGTCTCTGAAGCTGAATCCAAGCTTCACTCCTCTTCTCCT 150
      |||
Sbjct 40 ATGGATTACAGCTAGTCTTGTCTCTGAAGCTGAATCCAAGCTTCACTCCTCTTCTCCT 99

Query 151 CTCTTCCCTTTCACTCCATGTTCTTTTTCGCGCTCGCTCCGGTTTCTTCTTGCTAC 210
      |||
Sbjct 100 CTCTTCCCTTTCACTCCATGTTCTTTTTCGCGCTCGCTCCGGTTTCTTCTTGCTAC 159

Query 211 TCCCGCCGCCCTCTATTCTCCGGTTACCGTCTACGCCGGAAGAACTCTCCACAAAAT 270
      |||
Sbjct 160 TCCCGCCGCCCTCTATTCTCCGG-TTACCGTCTACGCCGGAAGAACTCTCCACAAAAT 218

Query 271 CAGTTCTGAATTCGATGACAGAA 293
      |||
Sbjct 219 CAGTTCTGAATTCGATGACAGAA 241
```

Figura 18 – Análise por BLASTn entre sequência obtida com oligonucleotídeo ‘SP6’ para pGR-2 (*rec* em pGEM-T) e sequência NM_106586. Notar elevada identidade (99%)

Após digestão de pARPAI-1 com *Hind*III e *Eco*RI, visualizaram-se 4 fragmentos em gel (~0,7 kb, 1,4 kb, 1,7 kb, 2,6 kb), tendo em vista a existência de um sítio *Hind*III interno na sequência sinal *rec* (Figura 14). Paralelamente, quando *Sac*I e *Kpn*I foram utilizadas, o fragmento *pai* (~1,3 kb) foi liberado do restante da construção (~5,1 kb) (Figura 14). O clone também foi submetido a sequenciamento com oligonucleotídeos ‘rec’ e ‘pai2’ confirmando-se a identidade da construção (não mostrado).

4.5.3 pHA9

O vetor pHA9 (CHRISTENSEN; QUAIL, 1996) foi utilizado para cotransformação com pAPAI ou pARPAI como marca de seleção, porque contém o gene *nptII*, que codifica a enzima neomicina fosfotransferase II. Com isso, explantes transformados expressando *nptII* de maneira estável tornam-se resistentes a antibióticos aminoglicosilados. Esse vetor teve sua identidade confirmada pela liberação de fragmentos de 844 pb (gene *nptII*) e 1719 pb após restrição enzimática com *Bam*HI e *Eco*RI, respectivamente (Figura 14).

4.6 Cultivo *in vitro* e transformação genética de cana-de-açúcar

Em cana-de-açúcar, as folhas enroladas e imaturas do “palmito” constituem as fontes de explantes preferidas para geração de calos embriogênicos, pois são altamente prolíficas e com rapidez (HO; VASIL, 1983; BOWER; BIRCH, 1992; FALCO; TULMANN NETO; ULIAN, 2000). Apesar de alguns esforços terem sido concentrados no desenvolvimento de métodos de embriogênese somática direta a partir de segmentos foliares (GILL; MALHOTRA; GOSAL, 2006) ou inflorescências em desenvolvimento (LAKSHMANAN et al., 2006; SNYMAN et al., 2006), a competência celular para transformação integrativa e alta regenerabilidade de plântulas de cana-de-açúcar ainda fazem dos calos embriogênicos o material preferido para uso em protocolos de transformação genética, sendo esta metodologia denominada embriogênese somática indireta. Os calos também oferecem como vantagem a possibilidade de serem mantidos *in vitro* por vários meses sem perder o potencial embriogênico em níveis importantes (FITCH; MOORE, 1993). Longos períodos de cultivo *in vitro* de células desdiferenciadas, no entanto, causam variação somaclonal mais expressiva (ARENCIBIA et al., 1999).

Figura 19 – Cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar cultivar IACSP93-3046. A) Ápice vegetativo. B) Explantes derivados de seções do ápice vegetativo. C) Detalhe de explante. D) Explante com 30 dias mostrando predomínio de calos embriogênicos. E) Explante com 30 dias mostrando predomínio de calos não embriogênicos. F) Placa com calos embriogênicos de 30 dias. G) Calos embriogênicos. H) Detalhe de calos embriogênicos. I) Detalhe de calos não embriogênicos

Seções transversais dos ápices vegetativos das cultivares ‘CTC2’, ‘IAC86-2480’, ‘IACSP93-3046’, ‘IACSP94-2094’, ‘IAC95-5000’, ‘RB855156’, ‘RB855536’, ‘R855453’,

‘RB867515’ foram cultivadas em MS₃ (Figura 19A-C), que contém 2,4-D, considerada a mais potente auxina para indução de embriogênese somática em cana-de-açúcar (HO; VASIL, 1983; LAKSHMANAN, 2006). Uma fonte adicional de arginina foi incluída por ser esse aminoácido um indutor de embriogênese (NIEVES et al., 2008).

Calos embriogênicos, isto é, de aspecto duro, compacto, nodulares e de coloração branco-amarelada (HO; VASIL, 1983; TAYLOR et al., 1992) foram separados e subcultivados (Figura 19D, F e H), à medida que calos mucilaginosos (brilhantes e de caráter não morfogênico em geral) foram eliminados durante o processo *in vitro* (Figura 19E, G e I).

A transformação genética da cultivar ‘IACSP93-3046’ está sumariamente representada na Figura 20. A produção de plantas transgênicas, considerando-se toda a fase de cultivo *in vitro*, não ocorreu em menos de 187 dias com protocolo adaptado de Bower e Birch (1992), Bower et al. (1996) e Falco, Tulmann Neto e Ulian (2000). O método empregado para transformação genética das plantas foi a biolística (SANFORD et al., 1991), cujo papel foi fundamental na geração das primeiras plantas transgênicas de *Saccharum* spp. (BOWER; BIRCK, 1992), e atualmente representa a tecnologia mais amplamente difundida para cana-de-açúcar. O bombardeamento com microprojéteis cobertos por DNA tem se mantido em posição de destaque especialmente por sua aplicabilidade em diversos genótipos e pela simplicidade de operação do equipamento (LAKSHMANAN et al., 2005).

Figura 20 – Fases do processo de transformação genética de cana-de-açúcar cultivar ‘IACSP93-3046’. A) Subcultivo de calos embriogênicos. B) Preparo de alvo. C) Detalhe de calo bombardeado com pAHC27 após ensaio histoquímico de GUS. D) Calos em MS₀ e presença de luz. E) Detalhe de calos. F) Brotos em regeneração. G) Calos bombardeados com pAPAI em MS₀ com geneticina e presença de luz. H) Detalhe de calos resistentes à geneticina. I) Brotos transgênicos presumíveis em regeneração. J) Plântula transgênica presumível K) Planta transgênica aclimatizada. L) Planta transgênica em casa de vegetação

Previamente aos disparos com microprojéteis cobertos por plasmídeos, calos embriogênicos subcultivados (Figura 20A) foram transferidos para MS₁ com manitol e sorbitol (Figura 20B). Pré-tratamento osmótico é indicado porque facilita a transformação transiente e estável pelo estado de plasmólise celular, uma vez que os danos causados pela penetração de partículas são reduzidos, prevenindo-se a extrusão de conteúdo citoplasmático (VAIN; McMULLEN; FINER, 1993). Nessas condições, um teste preliminar de avaliação da expressão transiente para atividade de GUS (JEFFERSON; KAVANAGH; BEVAN, 1987) foi realizado 24 h após bombardeamento de calos com o vetor pAHC27 (CHRISTENSEN; QUAIL, 1996), de maneira a permitir uma avaliação da qualidade do preparo das micropartículas e das condições de disparo (Figura 20C). Em seguida, experimentos de cobombardeamento independentes com construções de interesse pAPAI e pHA9 ou pARPAI e pHA9 foram conduzidos. Para a maioria das cultivares, porém, a quantidade de calos de boa qualidade foi insuficiente para a regeneração de plântulas transformadas após a biolística. Embora não fosse objetivo realizar criteriosa análise de cada cultivar, ‘CTC2’, ‘IACSP93-3046’ e ‘IAC95-5000’, aparentemente foram as melhores para cultivo *in vitro* e transformação genética. Dessas, todas produziram plântulas, porém apenas em ‘CTC2’ e ‘IACSP93-3046’ foi possível realizar análises moleculares em tempo hábil. Sendo assim, resultados dos experimentos de biolística para essas duas cultivares estão condensados na Tabela 3. Com a finalidade de regenerar controles representados por plântulas selvagens, calos não transformados foram cultivados em meio de cultura MS₁ e, posteriormente MS₀ em todos os experimentos (Figura 20D-F).

Procurando-se identificar as linhagens de calos possivelmente transgênicas para o gene *pai*, associado ou não à sequência sinal *rec*, foram planejados disparos com uma das construções desenvolvidas (pAPAI ou pARPAI) com um plasmídeo que possui marca de seleção *nptII*. Para tanto, pHA9 foi escolhido; esse plasmídeo contém o gene *nptII*, também referido na literatura como *neo*, que codifica a enzima neomicina fosfotransferase II e confere resistência a antibióticos como é o caso da canamicina e geneticina.

Tabela 3 – Experimentos de transformação por biolística de cultivares de cana-de-açúcar

Cultivar	Construção cobombardeada com pHA9	Nº de Placas	Nº de Plântulas	Plântulas positivas para <i>nptII</i>	Plântulas positivas para <i>nptII</i> e <i>pai</i>	Plântulas positivas para <i>nptII</i> e <i>rec-pai</i>	Frequência de transformação (%)*
CTC2	pAPAI	22	20	20	19	-	2,15
	pARPAI	12	24	-	-	-	-
	<i>Subtotal</i>	<i>34</i>	<i>44</i>	<i>20</i>	<i>19</i>	<i>-</i>	<i>2,15</i>
IACSP93-3046	pAPAI	15	18	12	10	-	1,67
	pARPAI	17	93	83	-	48	7,06
	<i>Subtotal</i>	<i>32</i>	<i>112</i>	<i>95</i>	<i>10</i>	<i>48</i>	<i>8,73</i>
	<i>Total</i>	<i>66</i>	<i>156</i>	<i>115</i>	<i>29</i>	<i>48</i>	<i>10,88</i>

*Plântulas cotransformadas $\times 100$ / número de placas $\times 40$ calos

Devido a elevados níveis de resistência endógena, a canamicina costuma ser pouco eficiente para seleção em monocotiledôneas (HAUPTMANN et al., 1988) e requer elevada concentração para eliminar calos não transformados de cana-de-açúcar (BOWER et al., 1996). Opção mais adequada para seleção *in vitro* é, nesse caso, a geneticina (BOWER; BIRCH, 1992; BOWER et al., 1996). Por isso, a geneticina foi incluída no meio de cultura MS₁ após a biolística de calos de ‘CTC2’ e ‘IACSP93-3046’. Na seleção do material bombardeado, a geneticina foi utilizada em concentração de 30 mg/L, durante os primeiros 15 dias da etapa de seleção, e de 50 mg/L, por todo o restante da fase *in vitro*. Permitiu identificação das linhagens resistentes após 30 dias, tendo os calos não transformados apresentado escurecimento bastante acentuado e, aparentemente cessado o crescimento na presença do antibiótico (Figura G-I). De acordo com trabalhos consultados, baixas concentrações de geneticina, variando entre 15-60 mg/L, costumam ser eficientes (INGELBRECHT, IRVINE; MIRKOV, 1999; FALCO; TULMANN NETO; ULIAN, 2000; McQUALTER et al., 2005).

Após regime de seleção com geneticina, de 44 plântulas obtidas para ‘CTC2’, 24 (60%) foram consideradas escapes e não indicaram presença do gene *nptII* em análises moleculares que

foram feitas posteriormente (Tabela 3). Esse valor pode estar associado a problemas técnicos, já que todos os escapes de ‘CTC2’ foram oriundos de apenas um dos experimentos (biolística com pARPAI), em que todas as plântulas regeneradas não comprovaram transgenia. Se excluído esse experimento, verifica-se que no outro experimento com ‘CTC2’ todas as 20 plântulas que foram resistentes à geneticina confirmaram-se transgênicas (biolística com pAPAI). Os experimentos com ‘IACSP93-3046’ mostram resultados mais homogêneos, sendo que apenas 17 (15,2%) das 112 plântulas de ‘IACSP93-3046’ regeneradas em meio com agente seletivo não confirmaram transgenia (Tabela 3). Escapes do regime de seleção *in vitro* são comuns, e foram reportados em 3% das plantas de cana-de-açúcar que foram cultivadas em meio de cultura com geneticina (FALCO; TULMANN NETO; ULIAN, 2000). Fatores como tamanho dos explantes utilizados, quantidade de subcultivos, cultivares e até mesmo a metodologia adotada para análise das plântulas podem explicar tais diferenças.

Outros sistemas eficientes de seleção “negativa” podem ser aplicados em células e tecidos de cana-de-açúcar quando plasmídeos que contêm outros genes de resistência são utilizados. Entre eles estão *hpt* (higromicina fosfotransferase) para seleção com antibiótico higromicina (ARENCIBIA et al., 1998), e os genes *bar* ou *pat* (fosfinotricina aciltransferase), que permitem o uso de fosfinotricina (PPT) ou herbicidas que possuem glufosinato de amônio em sua composição, como Bialaphos, Basta ou Finale (GALLO-MEAGHER; IRVINE, 1996; ELLIOTT et al., 1998; ENRÍQUEZ-OBREGÓN et al., 1998; LEIBBRANDT; SNYMAN, 2003).

Buscando reduzir o número de escapes e dispensar a utilização antibióticos ou herbicidas, regimes de seleção “positiva” têm sido estudados. Esses regimes são ditos alternativos porque incorporam um metabólito fisiologicamente inerte como agente seletivo e um gene marcador de seleção correspondente que confere uma vantagem metabólica. Com isso, a expressão do gene alivia os efeitos da seleção para inibição do crescimento das células transformadas. Em cana-de-açúcar, o único relato desse sistema refere-se ao uso do gene da fosfomanose isomerase de *E. coli* (*manA*) para seleção em meio de cultura suplementado com manose (JAIN et al., 2007). A manose é um açúcar inerte, que sofre fosforilação espontânea em manose-6-fosfato e causa fitotoxicidade quando esta é oferecida como única fonte de carbono. A fosfomanose isomerase (PMI) catalisa a interconversão reversível de manose-6-fosfato em frutose-6-fosfato, portanto permitindo que as células transformadas com *manA* assimilem a manose, o que torna o sistema viável para recuperação de plantas transgênicas.

4.6.1 Análise da presença de transgenes por PCR e *Southern blot*

Folhas de plântulas com raízes bem desenvolvidas e consideradas resistentes à geneticina foram coletadas e submetidas à extração de DNA total. Em uma caracterização preliminar, 44 plântulas CTC2 e 112 plântulas ‘IACSP93-3046’ foram estudadas quanto à amplificação com oligonucleotídeos ‘nptII’ (Tabela 3). Nessa análise, foi averiguada a presença de fragmento de 700 pb, correspondente à sequência *nptII* derivada do plasmídeo pHA9 utilizado na cotransformação. Porque a sequência codificadora de *nptII* é derivada do transposon Tn5 de *E. coli* (BECK et al., 1982), bactéria amplamente encontrada na natureza, e a avaliação de ensaios enzimáticos indica rápida digestão da proteína NPTII, este gene constitui risco mínimo de toxicidade ou alergenicidade em mamíferos, inclusive em humanos (FUCHS et al., 1993; ASTWOOD; LEACH; FUCHS, 1996). Segundo consulta à Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio, <http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/12786.html>), existem plantas de algodão transgênico para o gene *nptII* liberadas para plantio.

Para detectar a presença do gene *pai*, que foi isolado de *P. acnes* e clonado sob o controle do promotor da ubiquitina-1 nos vetores pAPAI ou pARPAI, amplificações com oligonucleotídeos ‘ubi1 sense’ e ‘pai2 antisense’ foram avaliadas nas amostras anteriormente comprovadas positivas para *nptII*. Os fragmentos esperados contêm uma pequena parte do íntron do gene *ubi1* (125 pb), que está situado acima promotor Ubi1 e do éxon *ubi1* em pAHC17L1, adicionado da sequência do transgene. Portanto, são esperados fragmentos de ~1,4 kb (*pai*) nos experimentos em que foram cobombardeados pAPAI e pHA9, e de ~1,6 kb (*rec-pai*) nos experimentos com pARPAI e pHA9. Nesse último caso, conduziu-se uma análise adicional com oligonucleotídeos ‘rec’ para verificar-se a presença de fragmento de 204 pb correspondente à sequência *rec* de pARPAI. Avaliaram-se todas as plântulas consideradas transgênicas para *nptII*, isto é, 20 plântulas ‘CTC2’ e 95 plântulas ‘IACSP93-3046’ (Tabela 3). As plântulas que não apresentaram resultado PCR-positivo, mesmo com repetição da técnica, foram consideradas escapes do processo seletivo. Em todas as análises por PCR foram realizados controle positivo com plasmídeos (pAPAI, pARPAI ou pHA9), controle negativo com DNA de planta não transformada e controle negativo de reação. Os resultados obtidos pela análise por PCR dos transgenes estão contidos na Tabela 3.

Da cultivar ‘CTC2’, 20 plântulas foram obtidas no conjunto de experimentos de cobombardeamento com pAPAI e pHA9, sendo que todas as plântulas apresentaram o fragmento

de 700 pb amplificado correspondente a *nptII* com oligonucleotídeos específicos (Tabela 3). Desse grupo, 19 foram demonstradas ser plântulas também positivas para *pai* (~1,4 kb). Na transformação de ‘CTC2’ com pARPAI e pHA9, no entanto, não foram produzidas plantas transgênicas, visto que nenhuma das 24 plântulas produzidas indicou *nptII* em análise molecular por PCR.

Na transformação de ‘IACSP93-3046’ com pAPAI e pHA9, 18 plântulas foram produzidas no conjunto de experimentos de cobombardeamento, sendo que dessas, 12 plântulas foram positivas para *nptII* e 10 delas foram posteriormente confirmadas para a presença de *pai* (~1,4 kb) (Tabela 3). No cobombardeamento com pARPAI e pHA9, produziram-se 93 plântulas da cultivar ‘IACSP93-3046’, sendo que 83 dessas plântulas foram positivas para *nptII* e 48 foram detectadas cotransformantes positivas para *rec-pai* (~1,6 kb) (Tabela 3).

Se analisado o total de placas bombardeadas e plântulas recuperadas, é possível calcular o número médio de plântulas produzidas por disparo (Tabela 3). Para a cultivar ‘CTC2’ e ‘IACSP93-3046’ foram geradas, respectivamente, 1,29 e 3,5 plântulas por disparo, mas esses valores são reduzidos a 0,56 ou 1,81 se consideradas apenas as plantas confirmadas como transgênicas de sequências de interesse (Tabela 3). Esses resultados são bastante similares ao encontrado em experimentos realizados com a cultivar ‘SP80-180’ (FALCO; TULMANN NETO; ULIAN, 2000). Uma média bem superior, entretanto, foi relatada por Bower et al. (1996), isto é, $19,8 \pm 3,7$ linhagens independentes por bombardeamento, após otimização do regime de seleção com geneticina para a cultivar australiana ‘Q117’. A grande variação no número de plantas recuperadas por disparo nos diferentes trabalhos pode ser, em partes, explicada pela resposta diferenciada de cada cultivar dentro do sistema de cultivo *in vitro*. Por exemplo, nos experimentos realizados por Wang et al. (2005), ‘Q117’ produziu em média 12 vezes mais linhagens resistentes à geneticina por placa bombardeada que a cultivar ‘H62-4671’.

Considerando-se que cada um dos alvos bombardeados era representado por um círculo formado por calos e o número de plântulas regeneradas que confirmaram presença de transgenes na análise por PCR, foi possível estimar a eficiência de transformação de cada de experimento (Tabela 3). A eficiência de transformação para *pai* ou *rec-pai* em cada conjunto de experimentos foi calculada pelo número de plântulas cotransformadas com pAPAI e pHA9 ou pARPAI e pHA9 dividido pelo número total de calos bombardeados, levando-se em conta 40 calos em cada placa. Os valores de eficiência obtidos nos experimentos para ‘CTC2’ bombardeada foram 2,15%

(pAPAI e pHA9) e 0% (pARPAI e pHA9) e, no caso de ‘IACSP93-3046’, 1,67% (pAPAI e pHA9) e 7,06% (pARPAI e pHA9). Baixos valores de eficiência de transformação são comumente reportados em cana-de-açúcar, como nos trabalhos de Christy et al. (2009) (10%), Melotto-Passarim (2009) (0,91%-1,12%) e Arvinth et al., (2010) (10%), embora não seja adequado fazer uma comparação direta por conta de variações na metodologia adotada. De qualquer forma, baixas eficiências de transformação são esperadas pelo fato de que somente cerca de 4% das células que mostram expressão transiente continuam a expressar o transgene por períodos maiores, o que indicaria provável expressão estável, de acordo com análise de atividade de GUS (FRANKS; BIRCH, 1991). Para que sejam produzidas plantas transgênicas é, tão logo, necessário que várias centenas de células regeneráveis apresentem expressão transiente em cada bombardeamento. Condição como essa pode ser alcançada com aumento da velocidade dos microprojéteis e com duplos disparos por placa de calos embriogênicos em ativo crescimento (BOWER; BIRCH, 1992).

Se dois plasmídeos separados – em uma situação em que um deles geralmente contém um gene de interesse e o outro, um gene de seleção – são coprecipitados e cobombardeados, é possível contabilizar também a frequência de plântulas que são transgênicas para ambos os genes. Esse parâmetro é chamado de frequência de cotransformação, porque avalia quantas das plântulas transgênicas possuem os transgenes cointegrados. Em plantas de cana-de-açúcar transformadas com pEmuKN (*nptII*) e pOsaGUS (*uidA*), Bower et al. (1996) reportaram frequências de cotransformação de 94%. Dentro do número de transgênicos obtidos no presente trabalho, a frequência de cotransformação foi estimada pela análise do número de plântulas PCR-positivas para *nptII* e *pai*, no caso da biolística com pAPAI e pHA9, ou para *nptII* e *rec-pai*, no cobombardeamento com pARPAI e pHA9. Embora a frequência de cotransformação dos genes *rec-pai* e *nptII* em ‘IACSP93-3046’ (pARPAI e pHA9) tenha sido de 57,83%, em 83,33% e 95% das plantas transgênicas ‘IACSP93-3046’ (pAPAI e pHA9) e ‘CTC2’ (pAPAI e pHA9), respectivamente, foram detectados *pai* e *nptII* juntos. Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam que as frequências de cotransformação podem ser particularmente altas em cana-de-açúcar transformada por biolística.

Após o fim da seleção, as plantas PCR-positivas e completamente regeneradas foram transferidas para vaso com substrato e mantidas em câmara úmida para aclimatização (Figura 20J e K), sendo em seguida mantidas em casa de vegetação (Figura 20L). Sobreviveram 7 plantas

transgênicas ‘CTC2-PAI’, 10 plantas ‘IACSP93-3046-PAI’ e 33 plantas ‘IACSP93-3046-RPAI’. Para todas as plantas ‘CTC2-PAI’ e ‘IACSP93-3046-PAI’ e para 10 plantas ‘IACSP93-3046-RPAI’ selecionadas aleatoriamente, as análises por PCR foram repetidas, corroborando os resultados previamente obtidos (Figuras 21, 22 e 23). Essas plantas foram também utilizadas para as análises moleculares posteriores.

Figura 21 – PCR de DNA genômico de cana-de-açúcar CTC2. A) Análise de *nptII*. Plantas transformadas com pAPAI e pHA9 (1-7). pHA9 (P). Planta não transformada (N'). Controle negativo de reação (N). *GeneRuler* 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen) (M). Fragmento de 700 pb (seta). B) Análise de *pai*. Plantas transformadas com pAPAI e pHA9 (1-7). pAPAI (P). Planta não transformada (N'). Controle negativo da reação (N). *GeneRuLer* 100 pb DNA Ladder (Fermentas) (M). Fragmento de 1,4 kb (seta). Géis 1% agarose

Figura 22 – PCR de DNA genômico de cana-de-açúcar IACSP93-3046. A) Análise de *nptII*. Plantas transformadas com pAPAI e pHA9 (1-10). pHA9 (P). Planta não transformada (N'). Controle negativo de reação (N). *GeneRuLer* 100 pb DNA *Ladder* (Fermentas) (M). Fragmento de 700 pb (seta). B) Análise de *pai*. Plantas transformadas com pAPAI e pHA9 (1-10). pAPAI (P). Planta não transformada (N'). Controle negativo de reação (N). 1 Kb DNA *Ladder* (Invitrogen) (M). Fragmento de 1,4 kb (seta). Abaixo: Géis 1% agarose

Figura 23 – PCR de DNA genômico de cana-de-açúcar IACSP93-3046. A) Análise de *nptII*. Plantas transformadas com pARPAI e pHA9 (1-10). pHA9 (P). Planta não transformada (N'). Controle negativo de reação (N). 1 Kb DNA *Ladder* (Invitrogen) (M). Fragmento de 700 pb (seta). Gel 1% agarose. B) Análise de *rec-pai*. Plantas transformadas com pARPAI e pHA9 (1-10). pARPAI (P). Planta não transformada (N'). Controle negativo de reação (N). 1 Kb DNA *Ladder* (Invitrogen) (M). Fragmento de 1,6 kb (seta). Gel 1% agarose. C) Análise de *rec*. Plantas transformadas com pARPAI e pHA9 (1-10). pARPAI (P). Planta não transformada (N'). Controle negativo de reação (N). 100 bp DNA *Ladder* (Invitrogen) (M). Fragmento de 204 pb (seta). Gel 1,5% agarose

Após 4-7 meses em casa de vegetação, algumas das plantas selecionadas ainda forneceram folhas para nova extração de DNA genômico e análise por *Southern blot*. Para avaliação de integração de *nptII* no genoma, 3 amostras de DNA de plantas PCR-positivas foram aleatoriamente escolhidas em cada experimento (plantas 2, 4 e 5 de 'CTC2-PAI'; 2, 5 e 10 de 'IACSP93-3046-PAI'; e 1, 7 e 9 de 'IACSP93-3046-RPAI') para digestão com *Bam*HI, que libera o gene *nptII*. Em todas as amostras de DNA isoladas de plantas transformadas detectou-se

uma banda de 844 pb correspondente ao transgene *nptII* liberado, sugerindo a integração desta sequência no genoma das plantas (Figura 24A), não tendo sido visualizadas bandas inespecíficas. As amostras de plantas não transformadas não apresentaram bandas. Apesar de a técnica de *Southern blot* ser comumente utilizada para fornecer evidência de integração de transgenes, incluindo inserção em múltiplos sítios, uma estimativa acurada do número de cópias não é possível porque a presença de múltiplas bandas pode também ser resultado de rearranjo e multimerização de transgenes em um sítio único de inserção (Register III, 1997).

Visando à estimativa do número de cópias dos transgenes, foram testadas enzimas que cortam uma única vez dentro da sequência dos plasmídeos utilizados e no sítio de reconhecimento mais próximo no genoma da planta. A sonda do gene *nptII* foi hibridizada com amostras de DNA de plantas digeridas com *HindIII*. Essa enzima corta uma única vez dentro da sequência derivada de pHA9. Não foi obtido resultado satisfatório de hibridização (não mostrado). Porém quando a mesma membrana foi re-hibridizada com a sonda *pai*, algumas das plantas ‘CTC2-PAI’ e ‘IACSP93-3046-PAI’ puderam ser avaliadas, porque *HindIII* corta uma vez pAPAI e, portanto, produz bandas de hibridização únicas para cada local de integração do transgene *pai*. As plantas 2, 5 e 10 do experimento ‘IACSP93-3046-PAI’ e a planta 2 do experimento ‘CTC2-PAI’ confirmaram duas a três cópias de *pai* do genoma (Figura 24B). Nova análise foi realizada com amostras digeridas com a enzima *SacI*, que cliva somente uma vez pAPAI e pARPAI, e marcadas com *pai*, mas produziram-se apenas bandas inespecíficas, não tendo sido possível estimar o número de cópias de *pai* nas plantas confirmadas transgênicas para *nptII* (não amostrado).

Figura 24 – Análise por *Southern blot* de DNA genômico de cana-de-açúcar CTC2 e IACSP93-3046 digerido com enzimas de restrição e hibridizado com sondas *nptII* e *pai*. A) Análise de presença de *nptII* em amostras digeridas com *Bam*HI. B) Análise de número de cópias de *pai* em amostras digeridas com *Hind*III. pHA9 (P) em A e pAPAI (P) em B. Plantas transformadas 2, 4 e 5 de ‘CTC2-PAI’ (2, 4 e 5). Plantas transformadas 2, 5 e 10 de ‘IACSP93-3046-PAI’ (2, 5 e 10). Plantas transformadas 1, 7 e 9 (1, 7 e 9) de ‘IACSP93-3046-RPAI’

Com a obtenção das primeiras plantas transgênicas de cana-de-açúcar, Bower e Birch (1992) estimaram de 1-3 cópias do gene *nptII* em análise por *Southern blot*. A transformação genética de plantas pelo bombardeamento de microprojéteis, no entanto, frequentemente resulta em eventos com múltiplas cópias. Em trabalho posterior do mesmo grupo de pesquisadores, 1 a 14 sítios de integração foram detectados, com média de 5 (BOWER et al., 1996). Diversos outros trabalhos também relatam números bastante variados de inserções em plantas transgênicas de cana-de-açúcar (INGELBRECHT; IRVINE; MIRKOV, 1999; FALCO; TULMANN NETO; ULIAN, 2000; MOLINARI et al., 2007).

Em geral, múltiplas cópias estão associadas com mecanismo de cossupressão e consequentemente com desligamento da expressão do transgene (MATZKE et al., 1996; IYER et al., 2000; KOHLI et al., 2003). Por esse motivo e também por facilitar a geração de plantas livres de marca de seleção, eventos com poucas cópias são preferíveis e são recuperados em maior frequência quando bombardeadas menores quantidades de DNA (LOWE et al., 2009). Sendo assim, as frequências de eventos com cópia única podem atingir valores comparáveis às obtidas pela transformação mediada por *Agrobacterium* (PRAKASH et al., 2009), que normalmente resulta em cópia única e inserção completa (SOMERS; MAKAREVITCH, 2004). A inserção é

aleatória como na biolística, mas usualmente o gene de interesse e o gene marcador seletivo estão contidos no mesmo T-DNA e se integram juntos ao genoma hospedeiro. Para obter um padrão de integração independente em diversos locais do genoma, de modo a facilitar a segregação e a eliminação da marca de seleção quando necessário, os genes podem ser alocados em dois T-DNAs separados (HUANG et al., 2004). Isso pode ser uma vantagem sobre o método análogo de cobombardeamento, que apesar de utilizar genes alocados em plasmídeos diferentes que são misturados e bombardeados juntos, frequentemente produz eventos com forte ligação de vários genes em um sítio único (ALTPETER et al., 2005). Entretanto, contra a tecnologia de *Agrobacterium* ainda estão as limitações decorrentes da dependência genotípica, um empecilho para a transformação da cana-de-açúcar por esta técnica (LAKSHMANAN et al., 2005), e a impossibilidade de eliminação das sequências não essenciais à expressão do transgene.

Para garantir padrões menos complexos de integração, a utilização de um cassete mínimo de expressão – um fragmento linear de DNA que contém apenas promotor, sequência codificadora e terminador –, ao invés de um vetor inteiro, é uma estratégia possível apenas na técnica de biolística. Empregando cassetes isolados, Fu et al. (2000) produziram grande número de plantas de arroz com baixo número de cópias (1-2) e pequena frequência de rearranjos, enquanto padrões complexos de integração foram detectados quando disparados plasmídeos inteiros *supercoiled* ou linearizados. A eliminação do *backbone* do vetor reduz a quantidade de substrato disponível para recombinação homóloga, previne interações homólogas entre transgenes diferentes e remove muito do estímulo que promove recombinação ilegítima, favorecendo a formação de locos intactos com cópia única, que são menos sujeitos ao silenciamento (KOHLI et al., 1999b; AGRAWAL et al., 2005).

Apesar dos esforços na obtenção de eventos com cópia única, outras publicações indicam que um maior número de cópias estaria associado com um maior nível de expressão (DATTA et al., 2003; TU et al., 2000; YE et al., 2001). Altos níveis de expressão foram relatados em trigo transgênico transformado com múltiplas cópias de genes-repórter (STOGER et al., 1998) e linhagens de arroz selecionadas para alto nível de expressão de produtos farmacêuticos mostraram conter 3 ou mais cópias do transgene (NANDI et al., 2002). Segundo Altpeter et al. (2005), apesar do difundido preceito de que um menor número de cópias é requerido para forte expressão, o que ocorre é o contrário. Porém, cada cassete de expressão deve estar intacto. A

presença de uma ou mais cópias rearranjadas pode levar ao silenciamento do transgene, mesmo se outras cópias estão intactas e funcionais (KOHLI et al., 1999a).

4.6.2 Análise de transcritos por RT-PCR e RT-qPCR

Para avaliar a expressão gênica, a análise por RT-PCR (Transcrição Reversa seguida de PCR) é amplamente utilizada porque pode detectar quantidades muito pequenas do transcrito-alvo com bastante especificidade devido à temperatura elevada usada no anelamento dos oligonucleotídeos exclusivos à sequência alvo. A alta sensibilidade é conferida pela natureza exponencial da PCR, a qual permite que sequências específicas sejam detectadas mesmo em amostras com poucas cópias presentes (GUÉNIN et al., 2009).

Folhas de plantas comprovadamente positivas por PCR para a presença dessas sequências serviram para extração de RNA total com intuito de avaliar a presença e quantidade de mRNAs derivados das sequências do transgene *pai* e da sequência sinal *rec*. Foram analisadas 7 plantas ‘CTC2-PAI’, 10 plantas ‘IACSP93-3046-PAI’ e 10 plantas ‘IACSP93-3046-RPAI’. Uma planta não transformada de cada experimento foi utilizada como controle negativo. A qualidade do RNA obtido pôde ser verificada em gel de agarose (não mostrado) e por espectrofotometria, tendo sido consideradas as amostras ótimas quando a razão A_{260}/A_{280} estava entre 1,8-2,0. O RNA foi então tratado com DNase I e empregado na síntese de cDNA por RT-PCR. Como controle negativo, uma alíquota de cada uma das amostras de RNA tratado com DNase I foi submetida a amplificação com oligonucleotídeos ‘ubi2’, específico para o gene endógeno da poliubiquitina 2 de cana-de-açúcar (*ubi2*), para comprovar a ausência de DNA nas amostras tratadas. Com exceção à amostra de DNA genômico, que foi utilizada como controle positivo e revelou banda de amplificação de ~200 pb, nenhum sinal de amplificação foi visualizado nas demais amostras, sugerindo que a DNase I agiu adequadamente (Figura 25).

Figura 25 – PCR de amostras de RNA de plantas de cana-de-açúcar tratado com DNase I. A) CTC2 cotransformadas com pARPAI e pHA9 (1-9). DNA genômico (P). Planta não transformada (N'). Controle negativo da reação (N). B) IACSP93-3046 transformadas com pAPAI e pHA9 (1-10). DNA genômico de IACSP93-3046 (P). Planta não transformada (N'). Controle negativo de reação (N). C) IACSP93-3046 transformadas com pARPAI e pHA9 (1-10). DNA genômico (P). Planta não transformada (N'). Controle negativo de reação (N). *GeneRuLer* 100 bp *DNA Ladder* Fermentas (M). Fragmento *ubi2* de ~200 pb (P, setas). Géis 1,5% agarose

As amostras de RNA foram então empregadas na síntese de cDNAs para análise de transcritos-alvo. Para eliminar mais uma vez a possibilidade de contaminação por DNA, as amostras de cDNA sintetizado foram testadas para amplificação com oligonucleotídeos 'cis' do gene endógeno cistationina- γ -sintase de cana-de-açúcar (*cis*). Os oligonucleotídeos desenhados para esse gene ancoram-se em éxons separados por íntron e, portanto, produzem fragmentos de

tamanhos diferentes a partir de DNA genômico e de cDNA. Não foi detectada contaminação com DNA genômico nas amostras, sendo que apenas as amostras de cDNAs revelaram banda de amplificação de ~200 pb (Figura 26A, 27A e 28A). A boa qualidade do cDNA foi ainda confirmada por PCR com oligonucleotídeos ‘ubi2’, que mostrou amplificação específica do fragmento de ~200 pb do gene *ubi2* em todas as amostras de cDNA (Figuras 26B, 27B e 28B), que foi também o gene endógeno escolhido como referência para quantificação de transcritos.

Em seguida, todas as amostras de cDNA foram empregadas em RT-PCR para análise da expressão dos transgenes dirigidos pelo promotor da ubiquitina 1 de milho das construções empregadas na transformação genética. Uma reação de amplificação foi conduzida empregando-se cDNA e oligonucleotídeos ‘paiRT’, de modo a detectar cDNAs derivados da expressão de *pai*. Em todas as amostras de plantas transformadas analisadas e nos controles positivos com pAPAI ou pARPAI foi possível verificar a presença de fragmento de 200 pb de *pai* (Figura 26C, 27C e 28C). Não houve amplificação nos controles negativos com cDNA de planta não transformada e no controle de reação (sem cDNA molde). Uma análise complementar feita com as plantas ‘IACSP93-3046-RPAI’ por RT-PCR com oligonucleotídeos ‘recRT’ confirmou a expressão dirigida por pUbi1 com base na observação de um fragmento de 123 pb derivado do cDNA da sequência sinal *rec* nas plantas transformadas e no plasmídeo pARPAI. Nos controles negativos não houve sinal de amplificação (Figura 28D).

Figura 26 – RT-PCR de cDNA cana-de-açúcar ‘CTC2’. Plantas transformadas com pAPAI e pHA9 (1-7). A) Análise de *cis* de ~200 pb (1-7, N’, seta). B) Análise de *ubi2* de ~200 pb (1-7, N’, seta). C) Análise de *pai* de 200 pb (1-7, P, seta). DNA genômico (P) em A e pAPAI (P) em B e C. Planta não transformada (N’). Controle negativo de reação (N). *GeneRuLer* 100 bp *DNA Ladder* Fermentas (M). Géis 1,5% agarose

Figura 27 – RT-PCR de cDNA cana-de-açúcar ‘IACSP93-3046’. Plantas transformadas com pAPAI e pH9 (1-10). A) Análise de *cis* de ~200 pb (1-10, N', seta). B) Análise de *ubi2* de ~200 pb (1-10, N', seta). C) Análise de *pai* de 200 pb (1-10, P, seta). DNA genômico em A (P) e pAPAI em B e C (P). Planta não transformada (N'). Controle negativo de reação (N). *GeneRuLer* 100 bp *DNA Ladder* Fermentas (M). Géis 1,5% agarose

Figura 28 – RT-PCR de cDNA cana-de-açúcar ‘IACSP93-3046’. Plantas cotransformadas com pARPAI e pH9A (1-10). A) Análise de *cis* de ~200 pb (1-10, N', seta). B) Análise de *ubi2* de ~200 pb (1-10, N', seta). C) Análise de *pai* de 200 pb (1-10, P, seta). D) Análise de *rec* de 123 pb (1-10, P, seta). DNA genômico de em A (P) e pARPAI em B, C e D. Planta não transformada (N'). Controle negativo de reação (N). *GeneRuLer* 100 bp *DNA Ladder* Fermentas (M). Géis 1,5% agarose

A detecção de bandas de amplificação derivadas de cDNAs de transgenes foi possível graças à atividade de pUbi1. O promotor é elemento fundamental no processo de

desenvolvimento de plantas transgênicas, visto que esta sequência é central na regulação de um gene, interferindo no nível de transcritos produzidos. A análise combinada dos experimentos aqui realizados sugere que pUbi1, presente em ambas as construções (pAPAI e pARPAI), dirigiu a expressão dos transgenes em nível detectável pela visualização em gel de RT-PCR. Em cana-de-açúcar, o promotor da ubiquitina 1 de milho (pUbi1) (CHRISTENSEN; QUAIL, 1996) é bastante utilizado, pois mostra níveis de expressão significativamente superiores ao do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV 35S) (GALLO-MEAGHER; IRVINE, 1996), este último muito conhecido por sua elevada atividade em dicotiledôneas transformadas. Além disso, pUbi1 de milho tem sido preferido sobre outros promotores isolados de monocotiledôneas ou desenvolvidos para esse grupo de plantas, como promotor da actina do arroz (Act1) (McELROY et al., 1991), promotor Emu sintético (LAST et al., 1991) ou mesmo promotores da poliubiquitina 4 e 9 de cana-de-açúcar (pUbi4 e pUbi9) (WEI et al., 2003) em inúmeros estudos de expressão constitutiva de transgenes em *Saccharum* spp. pUbi4 e pUbi9 dirigiram níveis razoáveis de expressão em calos de cana-de-açúcar, porém tiveram atividade de reduzida a não detectada em plantas regeneradas como consequência da ação de silenciamento gênico pós-transcricional.

Com isso, a identificação de novos promotores que possam produzir elevado nível de expressão em cana-de-açúcar tem sido alvo de diversos trabalhos. Dentre os promotores avaliados estão os promotores do fator de alongação 1 α de cana-de-açúcar, de genes codificadores de proteínas ricas em prolina SRP1 (YANG et al., 2003), da ubiquitina de arroz (RUBQ2) (LIU; OARD; OARD, 2003), de origem viral (SCHENK et al., 2001; BRAITHWAITE; GEIJSKES; SMITH, 2004) e de gene específico que codifica membro da subfamília SHAQYF de fatores de transcrição MYB (MUDGE et al., 2009).

Para quantificar os transcritos derivados do gene endógeno *ubi2* e dos transgenes dirigidos por pUbi1, os mesmos pares de oligonucleotídeos 'ubi2', 'paiRT' e 'recRT', foram incluídos na avaliação de expressão gênica por RT-qPCR. A técnica de RT-qPCR é útil para quantificação de transcritos, pois combina melhorias na sensibilidade e na especificidade com eficiente detecção de sinal de fluorescência. A intensidade de sinal, medida em tempo real, é relacionada com a quantidade de DNA produzido durante a PCR e se origina de um corante sequência não-específico (por exemplo, SYBR) que fluoresce quando se liga à molécula de dupla fita de DNA, ou de uma sonda fluorescente que se anela em uma sequência específica de DNA (GUÉNIN et al., 2009).

A validade do sinal detectado na RT-qPCR, foi previamente assegurada para especificidade de transcritos amplificados com os oligonucleotídeos ‘ubi2’, ‘paiRT’ e ‘recRT’ pela verificação da temperatura de dissociação do produto de PCR na curva de *melting*. A curva do gene endógeno *ubi2*, mostrou um padrão específico de temperatura de *melting* com pico em 88°C em todas as amostras de cDNAs de plantas, exceto nos plasmídeos pAPAI e pARPAI e no controle de reação (Figuras 29A-C). Em relação aos transgenes, o pico produzido na curva de *pai* nas amostras de cDNAs de plantas transgênicas indicou temperatura semelhante à desnaturação do produto na amostra do controle positivo pAPAI (83°C) em todas as linhagens ‘CTC2-PAI’, ‘IACSP93-3046-PAI’ e ‘IACSP93-3046-RPAI’ (Figuras 29A-C).

Nas amostras de plantas ‘IACSP93-3046-RPAI’, uma análise adicional feita com oligonucleotídeos ‘recRT’ indicou o pico relativo à sequência sinal *rec* em 83°C, estando este em congruência com controle positivo pARPAI (Figura 29C). Nos controles negativos, representados por amostra cDNA de planta não transformada e amostra sem cDNA molde, não se verificaram picos de dissociação, embora eventualmente picos em temperaturas menores possam ter sido observados, sugerindo a presença de dímeros de oligonucleotídeos, especialmente na ausência de molde para anelamento. A eficiência de amplificação calculada com um *pool* de amostras de cDNA para cada conjunto de experimentos foi de 1,7-1,8, 1,96 e 1,89 para *ubi2*, *pai*, e *rec*, respectivamente.

A quantificação dos transcritos foi baseada na expressão relativa dos genes alvos em relação ao gene referência (PFAFFL, 2001). A síntese de mRNA dos genes escolhidos como referência é considerada estável em vários tecidos e genótipos, porém o melhor referência deve ser escolhido de acordo com o organismo estudado. Em cana-de-açúcar alguns genes candidatos foram avaliados (ISKANDAR et al., 2004), porém outros têm sido testados em nosso laboratório. Como padrão endógeno para normalização dos alvos gene *pai* e da sequência sinal *rec*, foi escolhido o gene *ubi2*, que se mostrou boa estabilidade em cana-de-açúcar (ALMEIDA, 2007).

Figura 29 – Análise de expressão de plantas de cana-de-açúcar. A) 'CTC2'. Curvas de dissociação *ubi2*, *pai* e *rec*. Plantas 'CTC2-PAI' (PAI-1-7). Gráfico de expressão relativa de *pai*. B) 'IACSP93-3046'. Curvas de dissociação *ubi2*, *pai* e *rec*. Plantas 'IACSP93-3046-PAI' de 1 a 10 (PAI-1-10). Gráfico de expressão relativa de *pai* e *rec*. C) 'IACSP93-3046'. Curvas de dissociação *ubi2*, *pai* e *rec*. Plantas 'IACSP93-3046-RPAI' de 1 a 10 (RPAI-1-10). Gráficos de expressão relativa de *pai* e *rec*. Planta não transformada (N'). Controle negativo de reação (N)

Todas as plantas ‘CTC2-PAI’, ‘IACSP93-3046-PAI’ e ‘IACSP93-3046-RPAI’ positivas para RT-PCR, foram avaliadas quanto à abundância de transcritos. Nos experimentos de RT-qPCR para *pai* e *rec*, foram utilizadas plantas não transformadas como controles negativos, as quais apresentaram perfil semelhante ao controle negativo de reação e, por isso, não foram incluídas nos gráficos de expressão relativa. Nesses controles negativos, foram detectados valores de Ct elevados (acima de 40) pela fluorescência eventualmente captada da formação de dímeros de oligonucleotídeos. Dentro de cada experimento, as plantas transgênicas foram comparadas entre si quanto à abundância de transcritos. Os gráficos de expressão relativa obtidos foram ajustados para que a planta com menor nível de expressão em cada experimento apresentasse valor 1 em unidade arbitrária, enquanto as demais tiveram valores adequados relativamente. Nas linhagens ‘CTC2-PAI’ (Figura 29A), as plantas de 1 a 7 mostraram expressão relativa do transgene *pai* variando em unidades arbitrárias de 1,0 (‘CTC2-PAI-2’) a 2,53 (‘CTC2-PAI-7’). No experimento com ‘IACSP93-3046-PAI’ (Figura 29B), também se calculou expressão relativa de *pai* entre 1,0 (‘IACSP93-3046-PAI-6’) e 2,5 (‘IACSP93-3046-PAI-1’). Nos dados obtidos com referência às linhagens ‘IACSP93-3046-RPAI’ (Figura 29C), os transcritos produzidos pelo transgene *pai* com parte da sequência sinal *rec* foram averiguados com o par de oligonucleotídeos ‘paiRT’ e, adicionalmente, com ‘recRT’. Na análise com ‘paiRT’ foi detectada expressão relativa de 1,0 (‘IACS-10P93-3046-RPAI’) a 7,24 (‘IACSP93-3046-RPAI-6’). Para ‘recRT’, verificou-se expressão relativa de 1,0 (‘IACSP93-3046-RPAI-10’) a 4,78 (‘IACSP93-3046-RPAI-6’). Apesar de numericamente diferentes, os gráficos para *pai* e *rec* para ‘IACSP93-3046-RPAI’ apresentam perfis bastante semelhantes quando se comparam as duas análises. Esse fato é absolutamente coerente, considerando-se que o *pool* de transcritos foi analisado por igual metodologia, porém com os pares de oligonucleotídeos utilizados anelam em regiões diferentes do mesmo transcrito, isto é, naquela derivada do gene *pai* ou da sequência sinal *rec*.

Na análise de plantas transgênicas, a metodologia de RT-qPCR pode ser particularmente útil para escolha de linhagens com maior nível de expressão. Na avaliação por RT-qPCR de plantas de cana-de-açúcar transformadas com o gene da sorbitol 6-fosfato desidrogenase de macieira, Chong et al., (2007) verificaram que abundância de transcritos aumentou com a quantidade de sorbitol produzida nas plantas transgênicas. Além disso, essa técnica foi utilizada para correlacionar a quantidade de transcritos com quantidade de proteína detectada na análise de

Western blot em cana-de-açúcar transformada com genes da via de poli-hidroxibutirato (PHB) (PURNELL et al., 2007).

Variação nos níveis de expressão dos transgenes entre linhagens de plantas resultantes de experimentos de transformação genética podem ser decorrentes de vários motivos independentes do número de cópias. A primeira especulação refere-se ao local de inserção no genoma. Se os transgenes foram inseridos em uma região transcricionalmente ativa da eucromatina (KONCZ et al., 1989; HERMAN et al., 1990; KERTBUNDIT et al., 1991), a expressão deve ter sido influenciada por sequências regulatórias de genes endógenos próximos. Por outro lado, se foram inseridos dentro ou perto de DNA repetitivo ou heterocromatina, os transgenes podem ser inativados (PRÖLS; MEYER, 1992). Outro importante fator é o número de transgenes por sítio de integração. Nesse caso, cassetes de expressão inseridos no mesmo sítio cromossômico podem estar arranjados *head-to-tail* (tipo de repetição direta) e *head-to-head* ou *tail-to-tail* (tipos de repetições invertidas). Transgenes organizados em repetições invertidas frequentemente mostram baixa expressão, indicando silenciamento gênico em algum grau (JONES et al., 1987; JORGENSEN; SNYDER; JONES, 1987). O silenciamento gênico pode ocorrer como resultado da inativação do promotor, sendo denominado silenciamento gênico transcricional (TGS), ou em uma situação em que o promotor é ativo, mas os mRNAs não acumulam, nesse caso chamado de silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) (STAM; MOL; KOOTER, 1997).

Embora em todos os experimentos de RT-qPCR do presente trabalho tenha sido detectada expressão, que ocorreu em níveis variados entre os transformantes, essa análise foi isenta de repetições biológicas. Por ser a RT-qPCR altamente sensível, diversas regras devem ser seguidas para assegurar medições acuradas e reprodutíveis da abundância de transcritos (UDVARDI; CZECHOWSKI; SCHEIBLE, 2008). Infelizmente, não foi possível propagar as plantas de cana-de-açúcar em tempo hábil, sendo que cada amostra de cDNA foi representada por um único indivíduo de cada linhagem obtida. A variação verificada pode, portanto, ser imprecisa e mero efeito da técnica, embora por ora não seja possível descartar a possibilidade de ser consequência de diferentes padrões de integração

4.6.3 Análise de proteína por *Western blot*

Imunoensaios são as ferramentas mais comumente utilizadas para estudar o acúmulo de proteínas em plantas transgênicas. Com o intuito de detectar a proteína PAI, as plantas

transgênicas anteriormente analisadas por RT-PCR, forneceram folhas para extração de proteínas solúveis. Uma planta não transformada foi utilizada como controle negativo e como controle positivo aplicou-se a proteína PAI purificada de *E. coli*. O extrato proteico foi separado em sistema SDS-PAGE e transferido para membrana, que foi marcada com antissoro PAI e IgG conjugado com fosfatase alcalina.

Com a revelação da membrana marcada, foi possível detectar no controle positivo uma banda evidente de aproximadamente 50 kDa, que correspondente à proteína PAI. Foram incluídas todas as plantas ‘CTC2-PAI’, ‘IACSP93-3046-PAI’ e ‘IACSP93-3046-RPAI’ analisadas anteriormente para expressão gênica. As amostras de proteínas oriundas de folhas não apresentaram nenhuma banda evidente, porém com maior tempo de revelação, visualizaram-se bandas inespecíficas com mesmo perfil nas plantas transformadas e na planta não transformada (controle negativo) de 7 plantas ‘CTC2. Um dos *blots* produzidos está representado na Figura 30. Como bandas inespecíficas, decorrentes de reação cruzada, ocorreram dentro do intervalo em que seria esperada a detecção de sinal da proteína PAI, não foi possível determinar o sucesso da expressão da proteína recombinante. Essa situação é semelhante à comentada por Hornung et al. (2005), em que o mesmo soro anti-PAI foi utilizado na tentativa de detectar a proteína recombinante no extrato proteico de folhas de tabaco transgênico. Somente quando foram utilizadas proteínas obtidas de sementes para o preparo dos *immunoblots*, esses autores comprovaram a expressão de PAI.

Figura 30 – Análise de *Western blot* de IACSP93-3046. Plantas transformadas 1-5 (1-5). Planta não transformada (N'). PAI (P)

Além de um possível problema da técnica, outra explicação plausível para os resultados obtidos seria propriamente a não detecção de PAI por conta de não acúmulo ou pequeno acúmulo da proteína recombinante. A primeira justificativa para isso seria a ação do mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional, que é comum em cana-de-açúcar (WEI et al., 2003; INGELBRECHT; IRVINE; MIRKOV, 1999). Outro fator limitante poderia consistir na eficiência de tradução em razão do uso de códons em cana-de-açúcar ser diferente do procariótico, embora alteração da sequência procariótica nativa não tenha sido necessária para a detecção de *t10,c12*-CLA em sementes de arroz transgênico (KOHNO-MURASE et al., 2006). De qualquer maneira, a alteração dos códons dos primeiros 40 aminoácidos da região N-terminal é indicada para se obter maior nível de expressão de proteínas recombinantes (BATARD et al., 2000). Somente do uso de uma versão de *pai* com modificação dos códons para os 20 primeiros aminoácidos deste gene, adição de uma glicina abaixo da primeira metionina da proteína para criar uma sequência de Kozak, e uso de um consenso de ligação ribossomal em monocotiledôneas (CACC) acima do códon de iniciação (JOSHI et al., 1997), Hornung et al. (2005) conseguiram sucesso na expressão de proteína PAI em sementes de tabaco.

Diversas outras estratégias podem ser adotadas para elevar o nível de expressão de proteínas recombinantes em plantas (STREATFIELD, 2007). Uma delas é o endereçamento da proteína heteróloga para compartimentos subcelulares específicos. Por exemplo, algumas das proteínas codificadas no núcleo são sintetizadas no citoplasma como precursores com peptídeos de trânsito que as enviam para o cloroplasto (CLINE; HENRY, 1996). Assim, algumas sequências já identificadas permitem o endereçamento da proteína expressa para os plastídeos, organelas que realizam inúmeras reações metabólicas e considerados centrais na síntese de ácidos graxos (BROWER; SOMERVILLE, 1991; OHLROGGE; JAWORSKI, 1997). Entre elas está a sequência sinal *rec*, que foi utilizada na construção pARPAI do presente trabalho. Embora não tenhamos podido comprovar o endereçamento da proteína PAI aos plastídeos das plantas de cana-de-açúcar transformadas, em cebola, petúnia e tabaco este peptídeo de trânsito mostrou funcionar corretamente (KÖHLER et al., 1997; SANTOS, 2008). Em relação ao endereçamento para cloroplasto em cana-de-açúcar, os peptídeos de trânsito de plastídio de tomate DCL (*defective chloroplasts and leaves*) e RbcS (subunidade menor da rubisco) de tabaco (GNANASAMBANDAM; POLKINGHORNE; BIRCH, 2007), além de RbcS de *Pisum sativum* (PETRASOVITS et al., 2007) foram aparentemente mais eficientes que RbcS de milho

(McQUALTER et al., 2005), e constituem alternativas que poderiam ser utilizadas. Sequências de endereçamento para vacúolos (MA et al., 2000; GNANASAMBANDAM; BIRCH, 2004; WANG et al., 2005; GNANASAMBANDAM; POLKINGHORNE; BIRCH, 2007; WU e BIRCH, 2007; HAMERLI e BIRCH, 2010) e mitocôndrias (PETRASOVITS et al., 2007) são conhecidas em cana-de-açúcar e poderiam ser empregadas para outras finalidades.

Para expressão em cloroplasto, uma alternativa que se mostrou interessante em tabaco, resultando em níveis impressionantes de expressão (DEVINE; DANIELL, 2004; MALIGA, 2004 e ou SVAB; MALIGA, 2003), foi a geração via biolística de plantas transplastômicas, isto é, nas quais o genoma plastidial é modificado para incorporar sequências recombinantes. Como os plastídeos têm origem endossimbiótica, são considerados bastante adequados para expressão de proteínas procarióticas, como poderia ser o caso de PAI. Porém, até então, a transformação plastidial em cana-de-açúcar não foi estabelecida com sucesso e a aplicação dessa tecnologia é ainda praticamente inexistente em plantas não modelo.

4.6.4 Análise de ácidos graxos por Cromatografia Gasosa

Para análise do perfil de ácidos graxos por GC foram amostradas todas ‘CTC2-PAI’ e 7 plantas com maiores níveis de expressão na análise por RT-qPCR do experimento ‘IACSP93-3046-PAI’ (plantas 1, 2, 3, 4, 5, 7 e 10) e de ‘IACSP93-3046-RPAI’ (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8). Foram incluídas amostras de plantas não transformadas dos respectivos experimentos para comparação.

Nos cromatogramas avaliados, não houve nenhuma diferença evidente na composição de ácidos graxos de folhas de plantas transformadas e não transformadas e o pico correspondente a ι 10, ϵ 12-CLA não foi detectado em nenhuma das amostras. Portanto, até o momento, nenhuma planta transgênica foi identificada pelo acúmulo de ι 10, ϵ 12-CLA. Esse resultado pode ser decorrente da amostragem de plantas analisadas por experimento ou propriamente em razão do sistema utilizado como plataforma. Na hipótese de que a enzima PAI tenha sido produzida adequadamente nas plantas transgênicas de cana-de-açúcar, diversas limitantes poderiam explicar a não detecção de CLA. A primeira delas incorre no pequeno conteúdo de lipídeos, que responde por apenas 6% do peso seco das folhas em plantas (SOMERVILLE et al., 2000), sendo que o CLA, mesmo se produzido, poderia ocorrer em quantidades absolutas tão baixas que seriam presumivelmente inferiores ao limite de detecção análise de GC. Em associação a esse fator, está a disponibilidade de substrato para a enzima dentro ambiente celular (REZZONICO et al., 2004).

De acordo com a análise realizada (Tabela 4), as folhas de cana-de-açúcar contêm até 12% ácido linoleico – substrato de PAI para isomerização em *t10,c12*-CLA –, que está em quantidade cerca de 2,8 e 4,1 vezes menor que os ácidos graxos mais abundantes, respectivamente, palmítico (16:0) e linolênico (18:3^{Δ9Z,12Z,15Z}). Segundo informação na literatura, plantas transgênicas de tabaco também não acumularam CLA em tecidos vegetativos. Porém, *t10,c12*-CLA pôde ser detectado, ainda que em níveis bastante reduzidos (de até 0,3%), nos ácidos graxos esterificados das sementes quando plantas foram transformadas com uma versão do gene *pai* modificado para otimização do uso de códons. Nesse caso, o elevado conteúdo de ácido linoleico, que é o principal ácido graxo presente nas sementes de tabaco, possivelmente forneceu os precursores necessários para a síntese do CLA (HORNUNG et al., 2005). Em estudo com arroz transgênico transformado com o gene *pai*, sem ter havido modificação para códons preferenciais, *t10,c12*-CLA acumulou em até 1,6% dos lipídios totais das sementes. Embora a proporção relativa de ácido linoleico no total de ácidos graxos esterificados das sementes de arroz seja menor que nas sementes de tabaco, as primeiras apresentam maior conteúdo de ácidos graxos livres, os substratos de PAI (KOHNO-MURASE et al., 2006).

Tabela 4 – Análise de ácidos graxos de cana-de-açúcar

Ácido graxo	CTC2		IACSP93-3046			
	PAI	N'	PAI	N'	RPAI	N'
	(n = 7)		(n = 7)		(n = 7)	
12:0	0,9 ± 0,1	1,1	0,4 ± 0,1	0,3	0,6 ± 0,1	0,3
16:0	33,9 ± 2,0	39,3	36,3 ± 1,5	31,7	32,7 ± 2,7	30,3
18:0	1,6 ± 0,1	1,6	1,6 ± 0,1	1,3	1,7 ± 0,1	1,5
18:1 ^{Δ9Z}	0,7 ± 0,1	0,9	0,6 ± 0,0*	0,4	0,8 ± 0,1	0,6
18:2 ^{Δ9Z,12Z}	11,7 ± 0,4	13,2	12,1 ± 0,4	10,8	11,2 ± 0,2	10,6
18:2 ^{Δ10E,12Z} (<i>t10,c12</i> -CLA)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
18:3 ^{Δ9Z,12Z,15Z}	46,4 ± 2,5	38,2	44,6 ± 1,9	51,2	48,8 ± 3,1	53,4
Outros	2,29 ± 0,2	2,1	1,6 ± 0,16	1,7	1,7 ± 0,1	1,1

Os valores estão apresentados em massa (%) de ácidos graxos totais. As médias ± erro padrão foram obtidos de análises independentes (número entre parênteses) de folhas de plantas individuais. Não detectado (nd). Transformantes para pPAI (PAI). Transformantes para pARPAI (RPAI). Planta não transformada (N'). *Valor menor que 0,05

Outros elementos que podem ser especulados como interferentes negativos no acúmulo de ácidos graxos são a baixa incorporação de ácidos graxos em triacilglicerol (LARSON et al.,

2002), a exclusão de ácidos graxos da membrana lipídica (VOELKER; KINNEY, 2001) e a degradação (MOIRE et al., 2004). Com isso, a produção de ácidos graxos não usuais em plantas transgênicas geralmente resulta em valores abaixo das expectativas (JAWORSKI; CAHOON, 2003).

Uma vez provada como ser possível a introdução e expressão do gene *pai* em cana-de-açúcar, seria ainda importante investigar se o tipo de tecido (folhas em diferentes estágios e colmos), o direcionamento da enzima para diferentes compartimentos subcelulares ou mesmo a coexpressão de fosfolipases poderiam influenciar positivamente o acúmulo de CLA.

5 CONCLUSÕES

- O gene *pai* foi clonado e foram construídos vetores de expressão para *Escherichia coli* e monocotiledôneas;
- A análise de expressão heteróloga em *E. coli* revelou acúmulo da proteína recombinante;
- Foi possível transformar geneticamente calos embriogênicos pelo método biolístico e regenerar plântulas das cultivares de cana-de-açúcar ‘CTC2’ e ‘IACSP93-3046’ após regime de seleção com geneticina;
- Plantas de cana-de-açúcar obtidas foram comprovadas transgênicas e expressaram transcritos do gene *pai* dirigido pelo promotor constitutivo pUbi1;
- Embora a introdução e expressão do gene tenham sido provadas, a avaliação do perfil de ácidos graxos de folhas de cana-de-açúcar não identificou alterações evidentes do perfil de ácidos graxos;
- Fatores que possam afetar positivamente o acúmulo de CLA, como tipo de tecido, compartimentos subcelulares para direcionamento da proteína ou mesmo coexpressão de fosfolipases devem ser avaliados em mais detalhadamente.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, P. K.; KOHLI, A.; TWYMAN, R. M.; CHRISTOU, P. Transformation of plants with multiple cassettes generates simple transgene integration patterns and high expression levels. **Molecular Breeding**, Boston, v. 16, n. 3, p. 247-260, 2005.
- AKASHI K.; GRANDJEAN O.; SMALL, I. Potential dual targeting of an *Arabidopsis* archaebacterial-like histidyl-tRNA synthetase to mitochondria and chloroplasts. **FEBS Letters**, Amsterdam, n. 431, p. 39-44, 1998.
- ALJANABI, S. M.; FORGET, L.; DOOKUN, A. An improved and rapid protocol for the isolation of polysaccharide- and polyphenol-free sugarcane DNA. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 17, p. 1-8, 1999.
- ALMEIDA, R. S. **Perfil fisiológico e da expressão de transportadores de fosfato da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) durante a simbiose com micorriza arbuscular**. 2007. 187 p. Tese (Doutorado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- ALONSO, L.; CUESTA, E. P.; GILLILAND, S. E. Production of free conjugated linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of human intestinal origin. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 86, p. 1941-1946, 2003.
- ALTPETER, F.; BAISAKH, N.; BEACHY, R.; BOCK, R.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P.; DANIELL, H.; DATTA, K.; DATTA, S.; DIX, P. J.; FAUQUET, C.; HUANG, N.; KOHLI, A.; MOOIBROEK, H.; NICHOLSON, L.; THANH, T.; STOGER, E.; TAYLOR, N.; VISSER, R. Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. **Molecular Breeding**, Boston, v. 15, n. 3, p. 305-327, 2005.
- ANDRADE, J. B.; FERRARI JUNIOR, E.; POSSENTI, R. A.; OTSUK, I. P.; ZIMBACK, L.; LANDELL, M. G. A. Seleção de 39 variedades de cana-de-açúcar para a alimentação animal. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 40, n. 4, p. 287-296, 2003.
- ARENCIBIA, A. D.; CARMONA, E. R.; CORNIDE, M. T.; CASTIGLIONE, S.; O'RELLY, J.; CHINEA, A.; ORAMAS, P.; SALA, F. Somaclonal variation in insect-resistant transgenic sugarcane (*Saccharum* hybrid) plants produced by cell eletroporation. **Transgenic Research**, London, v. 8, n. 5, p. 349-360, 1999.
- ARENCIBIA, A. D.; CARMONA, E. R.; TÉLLEZ, P.; CHAN, M.-T.; YU, S.-M.; TRUJILLO, L. E.; ORAMAS, P. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp. L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Transgenic Research**, London, v. 7, n. 3, p. 213-222, 1998.

ARENCIBIA, A.; MOLINA, P.; GUITIERREZ, C.; FUENTES, A.; GREENIDGE, V.; MENENDEZ, E.; RIVA, G. De la; SELMAN, G. Regeneration of transgenic sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants from intact meristematic tissues transformed by eletroporation. **Biotecnología Aplicada**, Havana, v. 9, p. 156-165, 1992.

ARENCIBIA, A.; MOLINA, P.; RIVA, G. A. De la; SELMAN-HOUSEIN, G. Production of transgenic sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by intact cell eletroporation. **Plant Cell Reports**, New York, v. 14, n. 5, p. 305-309, 1995.

ARENCIBIA, A.; VÁSQUEZ, R. I.; PRIETO, D.; TÉLLEZ, P.; CARMONA, E. R.; COEGO, A.; HERNÁNDEZ, L.; RIVA, G. A. De la; SELMAN-HOUSEIN, G. Transgenic sugarcane plants resistant to stem borer attack. **Molecular Breeding**, Boston, v. 3, p. 247-255, 1997.

ARKION LIFE SCIENCES (United States). R. A. Rosson; M.-D. Deng; A. D. Grund.; S. S. Peng. **Linoleate isomerase WO 0100846-A**. 4 jan. 2001.

ARVINTH, S.; ARUN, S.; SELVAKESAVAN, R. K.; SRIKANTH, J.; MUKUNTHAN, N.; ANANDA KUMAR, P.; PREMACHANDRAN, M. N.; SUBRAMONIAN, N. Genetic transformation and pyramiding of aprotinin-expressing sugarcane with *cryIAb* for shoot borer (*Chilo infuscatellus*) resistance. **Plant Cell Reports**, New York, v. 29, n. 4, p. 383-395, 2010.

ASTWOOD, J. D.; LEACH, J. N.; FUCHS, R. L. Stability of food allergens to digestion *in vitro*. **Nature Biotechnology**, London, v. 14, n. 1269-1273, 1996.

AZAIN, M. J.; HAUSMAN, D. B.; SISK, M. B.; FLATT, W. P.; JEWELL, D. E. Dietary conjugated linoleic acid reduces rat adipose tissue cell size rather than cell number. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, p. 1548-1554, 2000.

AZEVEDO, J. A. G.; PEREIRA, J. C.; CARNEIRO, P. C. S.; QUEIROZ, A. C.; BARBOSA, M. H. P.; FERNANDES, A. M.; RENNÓ, F. P. Avaliação da divergência nutricional de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, n. 6, p. 1431-1442, 2003.

BARBA, R.; NICKELL, L. G. Nutrition and organ differentiation in tissue cultures of sugarcane, a monocotyledon. **Planta**, New York, v. 89, n. 3, p. 299-302, 1969.

BARBOSA, A. L. **Cultura de tecidos e regeneração de plantas transgênicas a partir de calos embriogênicos e de folhas imaturas de cana-de-açúcar**. 2010. 64 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

BATARD, Y.; HEHN, A.; NEDELKINA, S.; SCHALK, M.; PALLETT, K.; SCHALLER, H.; WERCK-REICHHART, D. Increasing expression of P450 and P450-reductase proteins from monocots in heterologous systems. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 379, n. 1, p. 161-169, 2000.

BAUMAN, D. E.; BAUMGARD, L. H.; CORL, B. A.; GRIINARI, J. M. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. **Proceedings of the American Society of Animal Science**, Albany, v. 48, p. 1-15, 1999.

BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J. M. Nutritional regulation of milk fat synthesis. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 23, p. 203-227, 2003.

BAUMGARD, L. H.; CORL, B. A.; DWYER, D. A.; SAEBO, A.; BAUMAN, D. E. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v. 278, n. 1, p. R179-R184, 2000.

BECK, E.; LUDWIG, G.; AUERSWALD, R.; REISS, B.; SCHALLER, H. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. **Gene**, Amsterdam, v. 19, n. 3, p. 327-336, 1982.

BEE, G. Dietary linoleic acid consumption during pregnancy and lactation influences growth and tissue composition in weaned pigs. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, p. 2281-2989, 2000.

BELURY, M. A.; MAHON, A.; BANNI, S. The conjugated linoleic acid (CLA) isomer, t10c12-CLA, is inversely associated with changes in body weight and serum leptin in subjects with type 2 diabetes mellitus. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 133, suppl., p. S257-S260, 2003. BIOEN. Disponível em: <<http://bioenfapesp.org>>. Acesso em: 17 nov. 2009.

BIRCH; R. G. Plant transformation: problems and strategies for practical application. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 297-326, 1997.

BOIN, C.; MATTOS, W. R. S.; D'ARCE, R. D. Cana-de-açúcar e seus subprodutos na alimentação de ruminantes. In: PARANHOS, S. B. (Ed.). **Cana-de-açúcar cultivado e utilização**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. v. 2, p. 805-856.

BORGES, J. C.; CAGLIARI, T. C.; RAMOS, C. H. I. Expression and variability of molecular chaperones in the sugarcane expressome. **Journal of Plant Physiology**, New York, v. 164, n. 4, p. 505-513, 2007.

BOWER, R.; BIRCH, R. G. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. **The Plant Journal**, Oxford, v. 2, n. 3, p. 409-416, 1992.

BOWER, R.; ELLIOTT, A. R.; POTIER, B. A. M.; BIRCH, R. G. High-efficiency, microprojectile-mediated cotransformation of sugarcane, using visible or selectable markers. **Molecular Breeding**, Boston, v. 2, n. 3, p. 239-249, 1996.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAITHWAITE, K. S.; GEIJSKES, R. J.; SMITH, G. R. A variable region of the Sugarcane Bacilliform Virus (SCBV) genome can be used to generate promoters of transgene expression in sugarcane. **Plant Cell Reports**, New York, v. 23, n. 5, p. 319-326, 2004.

BRODY, J. R.; KERN, S. E. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **BioTechniques**, Natick, v. 36, n. 2, p. 214-216, 2004.

BROWSE, J.; SOMERVILLE, C. Glycerolipid synthesis: biochemistry and regulation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 42, p. 467-506, 1991.

BRÜGGEMANN, H.; HENNE, A.; HOSTER, F.; LIESEGANG, H.; WIEZER, A.; STRITTMATTER, A.; HUJER, S.; DÜRRE, P.; GOTTSCHALK, G. The complete genome sequence of *Propionibacterium acnes*, a commensal of human skin. **Science**, Washington, v. 305, n. 5684, p. 671-673, 2004.

BRUMBLEY, S. M.; PURNELL, M. P.; PETRASOVITS, L. A.; NIELSEN, L. K.; TWINE, P. H. Developing the sugarcane biofactory for high-value biomaterials. **International Sugar Journal**, London, v. 109, n. 1297, p. 5-15, 2007.

BÜRGI, R. **Produção do bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp L.) auto-hidrolisado e avaliação do seu valor nutritivo para ruminantes**. 1985. 61 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1985.

BUTTERFIELD, M. K.; IRVINE, J. E.; VALDEZ GARZA, M.; MIRKOV, T. E. Inheritance and segregation of virus and herbicide resistance transgene in sugarcane. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 104, n. 5, p. 797-803, 2002.

CALSA JÚNIOR, T.; FIGUEIRA, A. Serial analysis of gene expression in sugarcane (*Saccharum* spp.) leaves revealed alternative C₄ metabolism and putative antisense transcripts. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 63, n. 6, p. 745-762, 2007.

CAMARGO, S. R. de. **Identificação de genes e uso de promotores modulador por etanol em cana-de-açúcar**. 2007. 83 p. Tese (Doutorado em Genética Vegetal e Melhoramento) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

CARMONA, E. R.; ARENCIBIA, A. D.; LÓPEZ, J.; SIMPSON, J.; VARGAS, D.; SALA, F. Analysis of genomic variability in transgenic sugarcane plants produced by *Agrobacterium tumefaciens* infection. **Plant Breeding**, Berlin, v. 124, n. 1, p. 33-38, 2005.

CARVALHO, G. J.; ANDRADE, L. A. B.; EVANGELISTA, A. R.; OLIVEIRA, P. S. R. Avaliação do potencial forrageiro de cinco variedades de cana-de-açúcar (ciclo de ano) em diferentes estádios de acréscimo. **STAB**, Piracicaba, v. 11, p. 16-23, 1993.

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**, New York, v. 6, n. 4, p. 297-301, 1987.

CHILTON, M. D.; DRUMMOND, M. H.; MERLO, D. J.; SCIAKY, D.; MONTOYA, A. L.; GORDON, M. P.; NESTER, E. W. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. **Cell**, Cambridge, v. 11, n. 2, p. 263-271, 1977.

CHIN, S. F.; LIU, W.; STORKSON, J. M.; HA, Y. A.; PARIZA, M. W. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 5, n. 3, p. 185-197, 1992.

CHIN, S. F.; STORKSON, J. M.; LIU, W.; ALBRIGHT, K. J.; PARIZA, M. W. Conjugated linoleic acid (9,11- and 10,12-octadecadienoic acid) is produced in conventional but not germ-free rats fed linoleic acid. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 124, n. 5, p. 694-701, 1994.

CHONG, B. F.; BONNETT, G. D.; GLASSOP, D.; O'SHEA, M. G.; BRUMBLEY, S. M. Growth and metabolism in sugarcane are altered by the creation of a new hexose-phosphate sink. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 5, n. 1, p. 240-253, 2007.

CHOUINARD, P. Y.; CORNEAU, L.; BARBANO, D. M.; METZGER, L. E.; BAUMAN, D. E. Conjugated linoleic acids alter milk fatty acid composition and inhibit milk fat secretion in dairy cows. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 129, p. 1579-1584, 1999.

CHOWDHURY, M. K. U.; VASIL, I. Stably transformed herbicide resistant callus of sugarcane via microprojectile bombardment of cell suspension cultures and eletroporation of protoplasts. **Plant Cell Reports**, New York, v. 11, p. 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**, London, v. 5, n. 3, p. 213-218, 1996.

CHRISTENSEN, A. H.; SHARROCK, R. A.; QUAIL, P. H. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by eletroporation. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 18, p. 675-679, 1992.

CHRISTOU, P. Genetic transformation of crop plants using microprojectile bombardment. **The Plant Journal**, Oxford, v. 2, n. 3, p. 275-281, 1991.

CHRISTY, L. A.; ARVINTH, S.; SARAVANAKUMAR, M.; KANCHANA, M.; MUKUNTHAN, N.; SRIKANTH, J. Engineering sugarcane cultivars with bovine pancreatic trypsin inhibitor (aprotinin) gene for protection against top borer (*Scirpophaga excerptalis* Walker). **Plant Cell Reports**, New York, v. 28, n. 2, p. 175-184, 2009.

CLINE, K.; HENRY, R. Import and routing of nucleus-encoded chloroplast proteins. **Annual Review of Cell Developmental Biology**, Palo Alto, v. 12, p. 1-26, 1996.

COOK, M. E.; MILLER, C. C.; PARK, Y.; PARIZA, M. W. Immune modulation by altered nutrient metabolism: nutritional control of immune-induced growth depression. **Poultry Science**, Menasha, v. 72, n. 7, p. 1301-1305, 1993.

D'HONT, A.; ISON, D.; ALIX, K.; ROUX, C.; GLASZMANN, J. C. Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of the ribosomal genes. **Genome**, Ottawa, v. 41, p. 221-225, 1998.

DAI, S.; ZHENG, P.; MARMEY, P.; ZHANG, S.; TIAN, W.; CHEN, S.; BEACHY, R. N.; FAUQUET, C. Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. **Molecular Breeding**, Boston, v. 7, n. 1, p. 27-33, 2001.

DANIELS, J.; ROACH, B. T. Taxonomy and evolution. In: HEINZ, D. J. (Ed.). **Sugarcane improvement through breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 7-84.

DATTA, K.; BAISAKH, N.; OLIVA, N.; TORRIZO, L.; ABRIGO, E.; TAN, J.; RAI, M.; REHANA, S.; AL-BABILLI, S.; BEYER, P.; POTRYKUS, I.; DATTA, S. K. Bioengineered 'golden' indica rice cultivars with β -carotene metabolism in the endosperm with hygromycin and mannose selection systems. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 1, n. 2, p. 81-90, 2003.

DE BLOCK, M.; HERRERA-ESTRELLA, L.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J.; ZAMBRYSKI, P. Expression of foreign genes in regenerated plants and their progeny. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 3, n. 8, p. 1681-1689, 1984.

DE VETH, M. J.; BAUMAN, D. E.; KOCH, W.; MANN, G. E.; PFEIFFER, A. M.; BUTLER, W. R. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 92, n. 6, p. 2662-2669, 2009.

DEMAREE, S. R.; GILBERT, C.; MERSMANN, H. J.; SMITH, S. B. Conjugated linoleic acid differentially modifies fatty acid composition in subcellular fractions of muscle and adipose tissue but not adiposity of postweanling pigs. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 132, p. 3272-3279, 2002.

DENG, M.-D.; GRUND, A. D.; SCHNEIDER, K. J.; LANGLEY, K. M.; WASSINK, S. L.; PENG, S. S.; ROSSON, R. A. Linoleic acid isomerase from *Propionibacterium acnes*: Purification, characterization, molecular cloning, and heterologous expression. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 143, p. 199-211, 2007.

DESPLECHIN, E. **Sugarcane in Brazil: the sustainable expansion**. In: World Biofuels Market Congress. Brussels, 2009. Disponível em: <http://www.unica.com.br/download.asp?mmdCode={0FF20FD0-4A93-4FDF-86FE-ABA32C7836EA}>>. Acesso em: 30 out. 2009.

DEVILLARD, E.; ANDANT, N.; WALLACE, R. Increased expression of a molecular chaperone GroEL in response to unsaturated fatty acids by the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 262, n. 2, p. 244-248, 2006.

DEVILLARD, E.; McINTOSH, F. M.; DUNCAN, S. H.; WALLACE, R. J. Metabolism of linoleic acid by human gut bacteria: different routes for biosynthesis of conjugated linoleic acid. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 189, n. 6, p. 2566-2570, 2007.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Gaithersburg, v. 12, p. 13-15, 1990.

DUGAN, M. E. R.; AALHUS, J. L.; JEREMIAH, L. E.; KRAMER, J. K. G.; SCHAEFER, A. L. The effects of feeding conjugated linoleic acid on subsequent pork quality. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 79, n. 1, p. 45-51, 1999.

DUGAN, M. E. R.; AALHUS, J. L.; SCHAEFER, A. L.; KRAMER, J. K. G. The effect of conjugated linoleic acid on fat to lean repartitioning and feed conversion in pigs. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 77, n. 4, p. 723-725, 1997.

DYM, O.; EISENBERG, D. Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins. **Protein Science**, New York, v. 10, n. 9, p. 1712-1728, 2001.

EGGERT, J. M.; BELURY, M. A.; KEMPA-STECZKO, A.; MILLS, S. E.; SCHINCKEL, A. P. Effects of conjugated linoleic acid on the belly firmness and fatty and fatty acid composition of genetically lean pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 79, n. 11, p. 2866-2872, 2001.

ELLIOTT, A. R.; CAMPBELL, J. A.; BRETTELL, R. I. S.; GROF, C. P. L. *Agrobacterium*-mediated transformation of sugarcane using GFP as a screenable marker. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v. 25, p. 739-743, 1998.

ELLIOTT, A. R.; CAMPBELL, J. A.; DUGDALE, B.; BRETTELL, R. I. S.; GROF, C. P. L. Green-fluorescent protein facilitates rapid in vivo detection of genetically transformed plant cells. **Plant Cell Reports**, New York, v. 18, n. 9, p. 707-714, 1999.

ENRÍQUEZ-OBREGÓN, G. A.; VÁZQUEZ-PADRÓN, R. I.; PRIETO-SAMSONOV, D. L.; RIVA, G. A. De la; SELMAN-HOUSEIN, G. Herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. **Planta**, New York, v. 206, n. 1, p. 20-27, 1998.

FALCO, M. C.; MENDES, B. M. J.; TULMANN NETO, A.; APPEZZATO DA GLÓRIA, B. Histological characterization of *in vitro* regeneration of *Saccharum* sp. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 8, n. 2, p. 93-97, 1996.

FALCO, M. C.; SILVA FILHO, M. C. Expression of soybean proteinase inhibitors in transgenic sugarcane plants: effects on natural defense against *Diatraea saccharalis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 41, n. 8, p. 761-766, 2003.

FALCO, M. C.; TULMANN NETO, A.; ULIAN, E. C. Transformation and expression of a gene for herbicide resistance in a Brazilian sugarcane. **Plant Cell Reports**, New York, v. 19, n. 12, p. 1188-1194, 2000.

FERREIRA, S. J.; KOSSMANN, J.; LLOYD, J. R.; GROENEWALD, J.-H. The reduction of starch accumulation in transgenic sugarcane cell suspension culture lines. **Biotechnology Journal**, Wheinheim, v. 3, n. 11, p. 1398-1406, 2008.

FIGUEIREDO, L. H. M. **Caracterização do gene LEAFY de *Saccharum* spp e análise filogenética entre diferentes espécies vegetais utilizando as seqüências da família LEAFY/FLORICAULA**. 2003. 117 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Comparada) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

FITCH, M. M. M.; MOORE, P. H. Long-term culture of embryogenic sugarcane callus. **Plant Cell Reports**, New York, v. 32, n. 3, p. 335-343, 1993.

FRANKS, T.; BIRCH, R. G. Gene transfer into intact sugarcane cells using microprojectile bombardment. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v. 18, n. 5, p. 471-480, 1991.

FREITAS, A. W. P.; PEREIRA, J. C.; ROCHA, F. C.; DETMANN, E.; BARBOSA, M. H. P.; RIBEIRO, M. D.; COSTA, M. G. Avaliação da divergência nutricional de genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 1, p. 229-236, 2006.

FRITSCH, J.; RICKERT, R.; STEINHART, H.; YURAWECZ, M. P.; MOSSOBA, M. M.; SEHAT, N.; ROACH, J. A. G.; KRAMER, J. K. G.; KU, Y. Conjugated linoleic acid (CLA) isomers: formation, analysis, amounts in foods, and dietary intake. **Lipid / Fett**, Weinheim, v. 101, n. 8, p. 272-276, 1999.

FU, X.; DUC, L. T.; FONTANA, S.; BONG B. B.; SUDHAKAR, D.; TWYMAN, R. M.; CHRISTOU, P.; KOHLI, A. Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate low-copy number transgenic plants with simple integration patterns. **Transgenic Research**, London, v. 9, n. 4, p. 11-19, 2000.

FUCHS, R. L.; REAM, J. E.; HAMMOND, B. G.; NAYLOR, M. W.; LEIMGRUBER, R. M.; BERBERICH, S. A. Safety assessment of the neomycin phosphotransferase II (NPTII) protein. **Bio/Technology**, New York, v. 11, p. 1543-1547, 1993.

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

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

GAMBLEY, R. L.; FORD, R.; SMITH, G. R. Microprojectile transformation of sugarcane meristems and regeneration of shoots expressing β -Glucuronidase. **Plant Cell Reports**, New York, v. 12, n. 6, p. 343-346, 1993.

GELVIN, S. B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 67, n. 1, p. 16-37, 2003.

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

GILBERT, R. A.; GLYNN, N. C.; COMSTOCK, J. C.; DAVIS, M. J. Agronomic performance and genetic characterization of sugarcane transformed for resistance to sugarcane yellow leaf virus. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 111, n. 1-2, p. 39-46, 2009.

GILL, R.; MALHOTRA, P. K.; GOSAL, S. S. Direct plant regeneration from cultured young leaf segments of sugarcane. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Boston, v. 84, n. 2, 227-231, 2006.

GNANASAMBANDAM, A.; BIRCH, R. G. Efficient developmental mis-targeting by the sporamin NTPP vacuolar signal to plastids in young leaves of sugarcane and *Arabidopsis*. **Plant Cell Reports**, New York, v. 23, n. 7, p. 435-447, 2004.

GNANASAMBANDAM, A.; POLKINGHORNE, I. G.; BIRCH, R. G. Heterologous signals allow efficient targeting of a nuclear-encoded fusion protein to plastids and endoplasmic reticulum in diverse plant species. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 5, n. 2, p. 290-296, 2007.

GRIINARI, J. M.; CORL, B. A.; LACY, S. H.; CHOUINARD, P. Y.; NURMELA, K. V. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Δ^9 -desaturase. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, n. 9, p. 2285-2291, 2000.

GRIINARI, J. M.; DWYER, D. A.; McGUIRE, M. A.; BAUMAN, D. E.; PALMQUIST, D. L.; NURMEL K. V. V. *Trans*-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 81, n. 5, p. 1251-1261, 1998.

GRIVET, L; ARRUDA, P. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an import tropical crop. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, p. 122-127, 2001.

GROENEWALD, J.-H.; BOTHA, F. C. Down-regulation of pyrophosphate: fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase (PFP) activity in sugarcane enhances sucrose accumulation in immature internodes. **Transgenic Research**, London, v. 17, n. 1, p. 85-92, 2008.

GUÉNIN, S.; MAURIAT, M.; PELLOUX, J.; VAN WUYTSWINKEL, O.; BELLINI, C.; GUTIERREZ, L. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 2, p. 487-493, 2009.

HAMERLI, D.; BIRCH, R. G. Transgenic expression of trehalulose synthase results in high concentrations of the sucrose isomer trehalulose in mature stems of field-grown sugarcane. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, p. 1-6, 2010.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, London, v. 22, n. 6, p. 145-146, 1973.

HAUPTMANN, R. M.; VASIL, V.; OZIAS-AKINS, 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**, Lancaster, v. 86, n. 2, p. 602-606, 1988.

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

HELLENS, R.; MULLINEAUX, P.; KLEE, H. A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 5, n. 10, p. 446-451, 2000.

HENAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY (China). J. Cao; Y. J. Wang; H. D. Yu; Y. N. Wang. **Cloning and expression of linoleate isomerase gene from *Lactobacillus acidophilus* AS1.1854 and properties of the recombinant enzyme**. 11 out. 2005.

HERMAN, L.; JACOBS, M.; MONTAGU, M.; DEPICKER, A. Plant chromosome/marker gene fusion assay for study of normal and truncated T-DNA integration events. **Molecular & General Genetics**, New York, v. 224, n. 2, p. 248-256, 1990.

HIEI, Y.; KOMARI, T.; KUBO, T. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 35, p. 205-218, 1997.

HIEI, Y.; OHTA, S.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. **The Plant Journal**, Oxford, v. 6, n. 2, p. 271-282, 1994.

HO, W.-J.; VASIL, I. K. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) I. The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. **Protoplasma**, Leipzig, v. 118, n.3, p. 169-180, 1983.

HOEKEMA, A.; HIRSCH, P. P.; HOOYKAAS, P. J. J.; SCHILPEROORT, R. A. A binary plant vector strategy based on separation of the *vir*- and T-region of *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. **Nature**, London, v. 303, p. 179-180, 1983.

HOOYKAAS, P. J. J.; BEIJERSBERGEN, A. G. M. The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 32, p. 157-181, 1994.

HOOYKAAS, P. J. J.; SCHILPEROORT, R. A. *Agrobacterium* and plant genetic engineering. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 19, n. 1, p. 15-38, 1992.

HORNUNG, E.; KRUEGER, C.; PERNSTICH, C.; GIPMANS, M.; PORZEL, A.; FEUSSNER, I. Production of (10*E*,12*Z*)-conjugated linoleic acid in yeast and tobacco seeds. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1738, n.1-3, p. 105-114, 2005.

HORSCH, R. B.; FRALEY, R. T.; ROGERS, S. G.; SANDERS, P. R.; HOFFMANN, N. Inheritance of functional genes in plants. **Science**, Washington, v. 223, n. 4635, p. 496-498, 1984.

HUANG, S.; GILBERTSON, L. A.; ADAMS, T. H.; MALLOY, K. P.; REISENBIGLER, E. K.; BIRR, D. H.; SNYDER, M. W.; ZHANG, Q.; LUETHY, M. H. Generation of marker-free transgenic maize by regular two-border *Agrobacterium* transformation vectors. **Transgenic Research**, London, v. 13, n. 5, o. 451-461, 2004.

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

IP, C.; DONG, Y.; IP, M. M.; BANNI, S.; CARTA, G.; ANGIONI, E.; MURRU, E.; SPADA, S.; MELIS, M. P.; SAEBO, A. Conjugated linoleic acid isomers and mammary cancer prevention. **Nutrition and Cancer**, Philadelphia, v. 43, n. 1, p. 52-58, 2002.

IRMAK, S.; DUNFORD, N. T.; GILLILAND, S. E.; BANSKALIEVA, V.; EISENMENGER, M. Biocatalysis of linoleic acid to conjugated linoleic acid. **Lipids**, Chicago, v. 41, n. 8, p. 771-776, 2006.

IRVINE, J. E.; MIRKOV, T. E. The development of genetic transformation of sugarcane in Texas. **Sugar Journal**, v. 60, p. 25-29, 1997.

ISKANDAR, H. M.; SIMPSON, R. S.; CASU, R. E.; BONNETT, G. D.; MACLEAN, D. J.; MANNERS, J. M. Comparison of reference genes for quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction analysis of expression in sugarcane. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 22, n. 4, p. 325-337, 2004.

IYER, L. M.; KUMPATLA, S. P.; CHANDRASEKHARAN, M. B.; HALL, T. C. Transgene silencing in monocots. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 43, n. 2-3, p. 323-346, 2000.

JAIN, M.; CHENGALRAYAN, K.; ABOUZID, A.; GALLO, M. Prospecting the utility of a PMI/mannose selection system for recovery of transgenic sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid) plants. **Plant Cell Reports**, New York, v. 26, n. 5, p. 581-590, 2007.

JAMES, C. Global status of commercialized biotech/GM crops. ISSA. n. 39, 2008, 243 p.

JEFFERSON, R. A.; KAVANAGH, T. A.; BEVAN, M. W. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 6, n. 13, p. 3901-3907, 1987.

JESUS, F. A. de. **Transformação genética de cana-de-açúcar com genes da aquaporina SspTIP1;1 e SspPIP1;4**. 2010. 55 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

JIN, S.; KOMARI, T.; GORDON, M. P.; NESTER, E. W. Genes responsible for the supervirulence phenotype of *Agrobacterium tumefaciens* A281. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 169, n. 10, p. 4417-4425, 1987.

JONES, J. D. G.; GILBERT, D. E.; GRADY, K. L.; JORGENSEN, R. A. T-DNA structure and gene expression in petunia plants transformed by *Agrobacterium tumefaciens* C58 derivatives. **Molecular & General Genetics**, New York, v. 207, n. 2-3, p. 478-485, 1987.

JORGENSEN, R.; SNYDER, C.; JONES, J. D. G. T-DNA is organized predominantly in inverted repeat structures in plants transformed with *Agrobacterium tumefaciens* C58 derivatives. **Molecular & General Genetics**, New York, v. 207, n. 2-3, p. 471-477, 1987.

JORNAL DA CANA. Disponível em: <http://www.jornalcana.com.br/Conteudo/Conheca%20o%20Setor.asp>. Acesso em: 16 jun. 2010.

JOSHI, C. P.; ZHOU, H.; HUANG, X.; CHIANG, V. L. Context sequences of translation initiation codon in plants. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 35, n. 6, p. 993-1001, 1997.

JOYCE, P. A.; McQUALTER, R. B.; BERNARD, M. J.; SMITH, G. R. Engineering for resistance to SCMV in sugarcane. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 461, p. 385-391, 1998.

JOYCE, P.; KUWAHATA, M.; TURNER, N.; LAKSHMANAN, P. Selection system and co-cultivation medium are important determinants of *Agrobacterium*-mediated transformation of sugarcane. **Plant Cell Reports**, New York, v. 29, n. 2, p. 173-183, 2010.

KANG, K.; LIU, W.; ALBRIGHT, K. J.; PARK, Y.; PARIZA, M. W. *trans*-10,*cis*-12 CLA inhibits differentiation of 3T3-L1 adipocytes and decreases PPAR γ expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 303, n. 3, p. 795-799, 2003.

KELLY, M. K.; BERRY, J. R.; DWYER, D. A.; GRINARI, J. M.; CHOUINARD, P. Y.; VAN AMBURGH, M. E.; BAUMAN, D. E. Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 128, p. 881-885, 1998.

KEMP, M. Q.; JEFFY, B. D.; ROMAGNOLO, D. F. Conjugated linoleic acid inhibits cell proliferation through a p53-dependent mechanism: effects on the expression of G1-restriction points in breast and colon cancer cells. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 133, p. 3670-3677, 2003.

KEPLER, C. R.; HIRONS, K. P.; McNEILL, J. J.; TOVE, S. B. Intermediates and products of biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 241, n. 6, p. 1350-1354, 1966.

KEPLER, C. R.; TOVE, S. B. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. III. Purification and properties of a linoleate Δ^{12} -cis, Δ^{11} -trans-isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 242, n. 24, p. 5686-5692, 1967.

KEPLER, C. R.; TUCKER, W. P.; TOVE, S. B. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. V. Stereospecificity of proton addition and mechanism of action of linoleic acid Δ^{12} -cis, Δ^{11} -trans-isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 246, n. 9, p. 2766-2771, 1971.

KERTBUNDIT, S.; DE GREVE, H.; DEBOECK, F.; VAN MONTAGU, M. *In vitro* random β -glucuronidase gene fusions in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 88, n. 12, p. 5212-5216, 1991.

KIKKERT, J. R.; HUMISTON, G. A.; ROY, M. K.; SANFORD, J. C. Biological projectiles for genetic transformation of plants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 35, n. 1, p. 43-50, 1999.

KIM, M. R.; PARK, Y.; ALBRIGHT, K. J.; PARIZA, M. W. Differential responses of hamsters and rats fed high-fat or low-fat diets supplemented with conjugated linoleic acid. **Nutrition Research**, New York, v. 22, n. 6, p. 715-722, 2002.

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**, New York, v. 6, p. 559-563, 1988.

KLEIN, T. M.; HARPER, E. C.; SVAB, Z.; SANFORD, J. C.; FROMM, M. E.; MALIGA, P. Stable genetic transformation of intact *Nicotiana* cells by particle bombardment process. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 85, n. 22, p. 8502-8505, 1988.

KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; WU, R.; SANFORD, J. C. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. **Nature**, London, v. 327, p. 70-73, 1987.

KÖHLER, R. H.; CAO, J.; ZIPFEL, W. R.; WEBB, W. W.; HANSON, M. R. Exchange of protein molecules through connections between higher plant plastids. **Science**, Washington, v. 276, n. 5321, p. 2039-2042, 1997.

KOHLI, A.; GAHAKWA, D.; VAIN, P.; LAURIE, D. A.; CHRISTOU, P. Transgene expression in rice engineered through particle bombardment: molecular factors controlling stable expression and transgene silence. **Planta**, Berlin, v. 208, n. 1, p. 88-97, 1999a.

KOHLI, A.; GRIFFITHS, S.; PALACIOS, N.; TWYMAN, R. M.; VAIN, P.; LAURIE, D. A.; CHRISTOU, P. Molecular characterization of transforming plasmid rearrangements in transgenic rice reveals a recombination hotspot in the CaMV 35S promoter and confirms the predominance of microhomology mediated recombination. **The Plant Journal**, Oxford, v. 17, n. 6, p. 591-601, 1999b.

KOHLI, A.; TWYMAN, R. M.; ABRANCHES, R.; WEGEL, E.; STOGER, E.; CHRISTOU, P. Transgene integration, organization and interaction in plants. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 52, n. 2, p. 247-258, 2003.

KOHNO-MURASE, J.; IWABUCHI, M.; ENDO-KASAHARA, S.; SUGITA, K.; EBINUMA, H.; IMAMURA, J. Production of *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid in rice. **Transgenic Research**, London, v. 15, n. 1, p. 95-100, 2006.

KOMARI, T.; HIEI, Y.; ISHIDA, Y.; KUMASHIRO, T.; KUBO, T. Advances in cereal gene transfer. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 1, p. 161-165, 1998.

KOMARI, T.; HIEI, Y.; SAITO, Y.; MURAL N.; KUMASHIRO, T. Vectors carrying two separate T-DNAs for cotransformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. **The Plant Journal**, Oxford, v. 10, n. 1, p. 165-174, 1996.

KONCZ, C.; MARTINI, N.; MAYERHOFER, R.; KONCZ-KALMAN, Z.; KÖRBER, H.; REDEI, G. P.; SCHELL, J. High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 86, n. 21, p. 8467-8471, 1989.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAKSHMANAN, P. Somatic embryogenesis in sugarcane – an addendum to the invited review ‘Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities’ In *Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 41 (4): 345-363; 2005. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 42, n. 3, p. 201-205, 2006.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R. J.; AITKEN, K. S.; GROF, C. L. P.; BONNETT, G. D.; SMITH, G. R. Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 41, n. 5, p. 345-363, 2005.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R. J.; WANG, L.; ELLIOTT, A.; GROF, C. P. L.; BERDING, N.; SMITH, G. R. Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp. interespecific hybrids) leaf culture. **Plant Cell Reports**, New York, v. 25, n. 10, p. 1007-1015, 2006.

LANDELL, M. G. A.; CAMPANA, M. P.; RODRIGUES, A. A.; CRUZ, G. M.; BATISTA, L. A. R.; FIGUEIREDO, P.; SILVA, M. A.; BIDOIA, M. A. P.; ROSSETTO, R.; MARTINS, A. L. M.; GALLO, P. B.; KANTHACK, R. A. D.; CAVICHIOLI, J. C.; VASCONCELOS, A. C. M.; XAVIER, M. A. A variedade IAC86-2480 como nova opção de cana-de-açúcar para fins forrageiros: manejo de produção e uso na alimentação animal. **Boletim Técnico IAC**, Campinas, 2002. n. 193, 36 p.

LAST, D. I.; BRETTELL, R. I. S.; CHAMBERLAIN, D. A.; CHAUDHURY, A. M.; LARKIN, P. J.; MARSH, E. L.; PEACOCK, W. J.; DENNIS, E. S. pEmu: an improved promoter for gene expression in cereal cells. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 81, n. 5, p. 581-588, 1991.

LEE, K. N.; KRITCHEVSKY, D.; PARIZA, M. W. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 108, n. 1, p. 19-25, 1994.

LEE, K. N.; PARIZA, M. W.; NTAMBI, J. M. Conjugated linoleic acid decreases hepatic stearyl-CoA desaturase mRNA expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 248, n. 3, p. 817-821, 1998.

LEE, L.-Y.; GELVIN, S. B. T-DNA binary vectors and systems. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 146, p. 325-332, 2008.

LEIBBRANDT, N. B.; SNYMAN, S. J. Stability of gene expression and agronomic performance of a transgenic herbicide-resistant sugarcane line in South Africa. **Crop Science**, Madison, v. 43, p. 671-677, 2003.

LIAVONCHANKA, A.; FEUSSNER, I. Biochemistry of PUFA double bond isomerases producing conjugated linoleic acid. **ChemBioChem**, Weinheim, v. 9, n. 12, p. 1867-1872, 2008.

LIAVONCHANKA, A.; HORNING, E.; FEUSSNER, I.; RUDOLPH, M. G. Structure and mechanism of the *Propionibacterium acnes* polyunsaturated fatty acid isomerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 8, p. 2576-2581, 2006.

LIU, D.; OARD, S. V.; OARD, J. H. High transgene expression levels in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) driven by the rice ubiquitin promoter RUBQ2. **Plant Science**, Shannon, v. 165, p. 743-750, 2003.

LOWE, B. A.; PRAKASH, N. S.; WAY, M.; MANN, M. T. Enhanced single copy integration events in corn via particle bombardment using low quantities of DNA. **Transgenic Research**, London, v. 18, n. 6, p. 831-840, 2009.

MA, H.; ALBERT, H. H.; PAULL, R.; MOORE, P. H. Metabolic engineering of invertase activities in different subcellular compartments affects sucrose accumulation in sugarcane cells. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v. 27, n. 11, p. 1021-1030, 2000.

MA, J. K-C.; CHIKWAMBA, R.; SPARROW, P.; FISCHER, R.; MAHONEY, R.; TWYMAN, R. M. Plant-derived pharmaceuticals – the road forward. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 10, n. 12, 2005.

MA, J. K-C.; DRAKE, P. M. W.; CHRISTOU, P. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 4, p. 794-805, 2003.

MALIGA, P. Plastid transformation in higher plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 289-313, 2004.

MANICKAVASAGAM, M.; GANAPATHI, A.; ANBAZHAGAN, V. R.; SUDHAKAR, B.; SELVARAJ, N.; VASUDEVAN, A.; KASTHURIENGAN, S. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and development of herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum* species hybrids) using axillary buds. **Plant Cell Reports**, New York, v. 23, n. 3, p. 134-143, 2004.

MANZANO, R. P.; PENATI, M. A.; NUSSIO, L. G. **Cana de açúcar na alimentação de bovinos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 2004. 29 p.

MASSO-WELCH, P. A.; ZANGANI, D.; VAUGHAN, M. M.; SHOEMAKER, S.; RAMIREZ, R. A.; IP, M. M. Inhibition of angiogenesis by the cancer chemopreventive agent conjugated linoleic acid. **Cancer Research**, Chicago, v. 62, p. 4383-4389, 2002.

MATSUOKA, S.; FERRO, J.; ARRUDA, P. The Brazilian experience of sugarcane ethanol industry. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 45, p. 372-381, 2009.

MATZKE, M. A.; MATZKE, A. J. M.; EGGLESTON, W. B. Paramutation and transgene silencing: a common response to invasive DNA? **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 1, n. 11, p. 382-388, 1996.

McELROY, D.; BLOWERS, A. D.; JENES, B.; WU, R. Construction of expression vectors based on the rice actin 1 (Act1) 5' region for use in monocot transformation. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 231, n. 1, p. 150-160, 1991.

McQUALTER, R. B.; CHONG, B. F.; MEYER, K.; Van DYK, D. E.; O'SHEA, M. G.; WALTON, N. J.; VIITANEN, P. V.; BRUMBLEY, S. M. Initial evaluation of sugarcane as a production platform for *p*-hydroxybenzoic acid. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 3, n. 1, p. 29-41, 2005.

McQUALTER, R. B.; DALE, J. L.; HARDING, R. M.; McMAHON, J. A.; SMITH, G. R. Production and evaluation of transgenic sugarcane containing a Fiji disease virus (FDV) genome segment S9-derived synthetic resistance gene. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 55, n. 2, p. 139-145, 2004.

MEDEIROS, S. R.; OLIVEIRA, D. E.; AROEIRA, L. J. M.; MCGUIRE, M. A.; BAUMAN, D. E.; LANNA, D. P. D. Effects of dietary supplementation of rumen-protected conjugated linoleic acid to grazing cows in early lactation. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 93, n. 3, p. 1126-1137, 2010.

MEDEIROS, S. R.; OLIVEIRA, D. E.; AROEIRA, L. J. M.; MCGUIRE, M.; BAUMAN, D. E.; LANNA, D. P. D. The effect of long-term supplementation of conjugated linoleic acid (CLA) to dairy cows grazing tropical pasture. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 83, suppl. 1, p. 169, 2000.

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

MIGUEL, C. M.; OLIVEIRA, M. M. Transgenic almond (*Prunus dulcis* Mill.) plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation of leaf explants. **Plant Cell Reports**, New York, v. 18, p. 387-393, 1999.

MILLER, C. C.; PARK, Y.; PARIZA, M. W.; COOK, M. E. Feeding conjugated linoleic acid to animals partially overcomes catabolic responses due to endotoxin injection. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 198, n. 3, p. 1107-1112, 1994.

MILNER, J. A. Functional foods and health promotion. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 129, suppl., p. S1395-S1397, 1999.

MOLINARI, H. B. C.; MARUR, C. J.; DAROS, E.; CAMPOS, M. K. F. de; CARVALHO, J. F. R. P. de; BESPALHOK FILHO, J. C.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 130, n. 2, p. 218-229, 2007.

MOREIRA, H. A.; PAIVA, J. A.; CRUZ, G. M.; VERNEQUE, R. S. Cana-de-açúcar adicionada de uréia e farelo de arroz em ganho de peso de novilhas mestiças leiteiras. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 16, n. 6, p. 500-506, 1987.

MUDGE, S. R.; OSABE, K.; CASU, R. E.; BONNETT, G. D.; MANNERS, J. M.; BIRCH, R. G. Efficient silencing of reporter transgenes coupled to know functional promoters in sugarcane, a highly polyploidy crop species. **Planta**, New York, v. 229, n. 3, p. 549-558, 2009.

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

NANDI, S.; SUZUKI, Y. A.; HUANG, J.; YALDA, D.; PHAM, P.; WU, L.; BARTLEY, G.; HUANG, N.; LÖNNERDAL, B. Expression of human lactoferrin in transgenic rice grains for the application in infant formula. **Plant Science**, Shannon, v. 163, n. 4, p. 713-722, 2002.

NAPIER, J. A. The production of unusual fatty acids in transgenic plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 58, p. 295-319, 2007.

NIEVES, N.; SAGARRA, F.; GANZÁLEZ, R.; LEZCANO, Y.; CID, M.; BLANCO, M. A.; CASTILLO, R. Effect of exogenous arginine on sugarcane (*Saccharum* sp.) somatic embryogenesis, free polyamines and the contents of the soluble proteins and proline. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Boston, v. 95, n. 3, p. 313-320, 2008.

NOGUEIRA, F. T. S.; ROSA JÚNIOR de, V. E.; MENOSSI, M.; ULIAN, E. C.; ARRUDA P. RNA expression profiles and data mining of sugarcane response to low temperature. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 132, p. 1811-1824, 2003.

NOGUEIRA, F. T. S.; SCHLÖGL, P. S.; CAMARGO, S. R.; FERNANDEZ, J. H.; ROSA JÚNIOR, V. E. de; POMPERMAYER P.; ARRUDA, P. SsNAC23, a member of the NAC domain protein family, is associated with cold, herbivory and water stress in sugarcane. **Plant Science**, Shannon, v. 169, p. 93-106, 2005.

NUTT, K. A. Characterisation of proteinase inhibitors from canegrubs for possible application to genetically engineer pest-derived resistance into sugarcane. 2005. 205 p. Thesis (Doctor of Philosophy) – School of Life Sciences, Queensland University of Technology, Brisbane, 2005.

O'QUINN, P. R.; NELSEN, J. L.; GOODBAND, R. D.; UNRUH, J. A.; WOODWORTH, J. C.; SMITH, J. S.; TOKACH, M. D. Effects of modified tall oil versus a commercial source of conjugated linoleic acid and increasing levels of modified tall oil on growth performance and carcass characteristics of growing-finishing pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 78, n. 9, p. 2359-2358, 2000.

OHLROGGE, J. B.; JAWORSKI, J. G. Regulation of fatty acid synthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 109-136, 1997.

OHNUKI, K.; HARAMIZU, S.; ISHIHARA, K.; FUSHIKI, T. Increased energy metabolism and suppressed body fat accumulation in mice by a low concentration of conjugated linoleic acid. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, Tokyo, v. 65, n. 10, p. 2200-2204, 2001.

OSABE, K.; MUDGE, S. R.; GRAHAM, M. W.; BIRCH, R. G. RNAi mediated down-regulation of *PDS* gene expression in sugarcane (*Saccharum*), a highly polyploid crop. **Tropical Plant Biology**, New York, v. 2, p. 143-148, 2009.

OSTROWSKA, E.; MURALITHARAN, M.; CROSS, R. F.; BAUMAN, D. E.; DUNSHEA, F. R. Dietary conjugated linoleic acids increase lean tissue and decrease fat deposition in growing pigs. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 129, p. 2037-2042, 1999.

OSTROWSKA, E.; SUSTER, D.; MURALITHARAN, M.; CROSS, R. F.; LEURY, B. J.; BAUMAN, D. E.; DUNSHEA, F. R. Conjugated linoleic acid decreases fat accretion in pigs: evaluation by dual-energy X-ray absorptiometry. **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 89, p. 219-229, 2003.

PARIZA, M. W. CLA (conjugated linoleic acid) references | Food Research Institute | UW-Madison. Disponível em: <<http://fri.wisc.edu/clarefs.htm>>. Acesso em: 13 jun. 2010.

PARIZA, M. W.; HARGRAVES, W. A. A beef-derived mutagenesis modulator inhibits initiation of mouse epidermal tumors by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. **Carcinogenesis**, New York, v. 6, n. 4, p. 591-593, 1985.

PARIZA, M. W.; PARK, Y.; COOK, M. E. Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: evidence and speculation. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Malden, v. 223, p. 8-13, 2000.

PARIZA, M. W.; PARK, Y.; COOK, M. E. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. **Progress in Lipid Research**, Elmsford, v. 40, n. 4, p. 283-298, 2001.

PARK, Y.; ALBRIGHT, K. J.; LIU, W.; PARIZA, M. W. Evidence that *trans*-10,*cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. **Lipids**, Chicago, v. 34, n. 3, p. 235-241, 1999.

PARK, Y.; ALBRIGHT, K. J.; LIU, W.; STORKSON, J. M.; COOK, M. E.; PARIZA, M. W. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. **Lipids**, Chicago, v. 32, n. 8, p. 853-858, 1997.

PARK, Y.; PARIZA, M. W. Mechanisms of body fat modulation by conjugated linoleic acid (CLA). **Food Research International**, Ottawa, v. 40, n. 3, p. 311-323, 2007.

PARK, Y.; STORKSON, J. M.; NTAMBI, J. M.; COOK, M. E.; SIH, C. J.; PARIZA, M. W. Inhibition of hepatic stearyl-CoA desaturase activity by *trans*-10,*cis*-12 conjugated linoleic acid and its derivatives. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1486, p. 285-292, 2000.

PASZKOWSKI, J.; SHILLITO, R. D.; SAUL, M.; MANDAK, V.; HOHN, T.; HOHN, B.; POTRYKUS, I. Direct gene transfer to plants. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 3, n. 12, p. 2717-2722, 1984.

PATE, F. M. Fresh sugar cane in growing-finishing steer diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 53, n. 4, p. 881-888, 1981.

PATE, F. M. Fresh sugar cane in growing-finishing steer diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 53, p. 881, 1981.

PENG, S. S.; DENG, M.-D.; GRUND, A. D.; ROSSON, R. A. Purification and characterization of a membrane-bound linoleic acid isomerase from *Clostridium sporogenes*. **Enzyme and Microbial Technology**, Guildford, v. 40, n. 4, p. 831-839, 2007.

PETRASOVITS, L. A.; PURNELL, M. P.; NIELSEN, L. K.; BRUMBLEY, S. M. Production of polyhydroxybutyrate in sugarcane. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 5, n. 1, p. 162-172, 2007.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v. 29, n. 9, p. 2002-2007, 2001.

POTRYKUS, I. Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Boston, v. 42, p. 205-225, 1991.

PRAKASH, N. S.; BHOJARAJA, R.; SHIVBACHAN, S. K.; HARI PRIYA, G. G.; NAGRAJ, T. K.; PRASAD, V.; SRIKANTH BABU, V.; JAYAPRAKASH, T. L.; DASGUPTA, S. Marker-free transgenic corn plant production through co-bombardment. **Plant Cell Reports**, New York, v. 28, n. 11, p. 1655-1668, 2009.

PRÖLS, F.; MEYER, P. The methylation patterns of chromosomal integration regions influence gene activity of transferred DNA in *Petunia hybrida*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 2, n. 4, p. 465-475, 1992.

PURNELL, M. P.; PETRASOVITS, L. A.; NIELSEN, L. K.; BRUMBLEY, S. M. Spatio-temporal characterization of polyhydroxybutyrate accumulation in sugarcane. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 5, p. 173-184, 2007.

RASMUSSEN, J. L.; KIKKERT, J. R.; ROY, M. K.; SANFORD, J. C. Biolistic transformation of tobacco and maize suspension cells using bacterial cells as microprojectiles. **Plant Cell Reports**, New York, v. 13, n. 3-4, p. 212-217, 1994.

RATHUS, C.; BIRCH, R. G. Stable transformation of callus from electroporated sugarcane protoplasts. **Plant Science**, Shannon, v. 82, n. 1, p. 81-89, 1992.

RECH, E. L.; VIANNA, G. R.; ARAGÃO, F. J. L. High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. **Nature Protocols**, London, v. 3, n. 3, p. 410-418, 2008.

REGISTER III, J. C. Approaches to evaluating the transgenic status of transformed plants. **Trends in biotechnology**, Amsterdam, v. 15, p. 141-146, 1997.

RIBEIRO, C. W.; SOARES-COSTA, A.; FALCO, M. C.; CHABREGAS, S. M.; ULIAN, E. C.; COTRIN, S. S.; CARMONA, A. K.; SANTANA, L. A.; OLIVA, M. L. V.; HENRIQUE-SILVA, F. Production of a His-tagged canecystatin in transgenic sugarcane and subsequent purification. **Biotechnology Progress**, New York, v. 24, n. 5, p. 1060-1066, 2008.

ROCHA, R. R.; PAPINI-TERZI, F. S.; NISHIYAMA JÚNIOR, M. Y.; VÊNCIO, R. Z. N.; VICENTINI, R.; DUARTE, R. D. C.; ROSA JÚNIOR, V. E. de; VINAGRE, F.; BARSALOBRES, C.; MEDEIROS, A. H.; RODRIGUES, F. A.; ULIAN, E. C.; ZINGARETTI, S. M.; GALBIATTI, J. A.; ALMEIDA, R. S.; FIGUEIRA, A. V. O.; HEMERLY, A. S.; SILVA-FILHO, M. C.; MENOSSE, M.; SOUZA, G. M. Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. **BMC Genomics**, London, v. 8, n. 71, p. 1-22, 2007.

ROCHE, H. M.; NOONE, E.; SEWTER, C.; BENNETT, S. M.; SAVAGE, D.; GIBNEY, M. J.; O'RAHILLY, S.; VIDAL-PUIG, A. J. Isomer-dependent metabolic effects of conjugated linoleic acid: insights from molecular markers sterol regulatory element-binding protein-1c and LXR α . **Diabetes**, New York, v. 51, n.7, p. 2037-2044, 2002.

ROSBERG-CODY, E.; JOHNSON, M. C.; FITZGERALD, G. F.; ROSS, P. R.; STANTON, C. Heterologous expression of linoleic acid isomerase from *Propionibacterium acnes* and anti-proliferative activity of recombinant *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid. **Microbiology**, Washington, v. 153, p. 2483-2490, 2007.

ROSSI, M.; ARAUJO, P. G.; PAULET, F.; GARSMEUR, O.; DIAS, V. M.; CHEN, H.; VAN SLUYS, M.-A.; D'HONT, A. Genomic distribution and characterization of EST-derived resistance gene analogs (RGAs) in sugarcane. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 269, n. 3, p. 406-419, 2003.

ROSSOUW, D.; BOSCH, S.; KOSSMANN, J.; BOTHA, F. C.; GORENEWALD, J.-H. Downregulation of neutral invertase activity in sugarcane cell suspension cultures leads to a reduction in respiration and growth and an increase in sucrose accumulation. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 34, n. 6, p. 490-498, 2007.

SACILOTO, R. F. Z. **Inserção do gene PR5K em cana-de-açúcar visando induzir resistência ao fungo da ferrugem *Puccinia melanocephala***. 2003. 74 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

SÆBØ, A. Commercial synthesis of conjugated linoleate. In: SÉBÉDIO, J.-L.; CHRISTIE, W. W.; ADLOF, R. (Ed.). **Advances in conjugated linoleic acid research**. Illinois: AOCS Press, 2003. chap. 5, p. 71-81.

SOMERVILLE, C.; BROWSE, J.; JAWORSKI, J. G.; OHLROGGE, J. B. Lipids. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R (Ed.). **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. chap. 10, p. 456-527.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 3 v.

SANFORD, J. C. The development of the biolistic process. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 36, n. 5, p. 303-308, 2000.

SANFORD, J. C.; DeVIT, M. J.; RUSSELL, J. A.; SMITH, F. D.; HARPENDING, P. R.; ROY, M. K.; JOHNSTON, S. A. An improved helium driven biolistic device. **Technique**, v. 3, p. 3-16, 1991.

SANFORD, J. C.; KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; ALLEN, N. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. **Journal of Particle Science and Technology**, v. 5, n. 1, p. 27-37, 1987.

SCHENK, P. M.; REMANS, T.; SÁGI, L.; ELLIOTT, A. R.; DIETZGEN, R. G.; SWENNEN, R.; EBERT, P. R.; GROF, C. P. L.; MANNERS, J. M. Promoters for pregenomic RNA of banana streak badnavirus are active for transgene expression in monocot and dicot plants. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 47, n. 3, p. 399-412, 2001.

SCHMIDT, P.; MARI, L. J.; NUSSIO, L. G.; PEDROSO, A. F.; FÁTIMA PAZIANI, S. de; WECHSLER, F. S. Aditivos químicos e biológicos na ensilagem de cana-de-açúcar. 1. Composição química das silagens, ingestão, digestibilidade e comportamento ingestivo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 5, p. 1666-1675, 2007. Supplement.

SÉBÉDIO, J.-L.; GNAEDIG, S.; CHARDIGNY, J.-M. Recent advances in conjugated linoleic acid research. **Current Opinion Clinical Nutrition Metabolic Care**, Philadelphia, v. 2, n. 6, p. 499-506, 1999.

SÉTAMOU, M.; BERNAL, J. S.; LEGASPI, J. C.; MIRKOV, T. E.; LEGASPI JUNIOR, B. C. Evaluation of lectin-expressing transgenic sugarcane against stalkborers (Lepidoptera: Pyralidae): effects on life history parameters. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 95, n. 2, p. 469-477, 2002.

SHENG, O. J.; CITOVSKY, V. *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 10, p. 1699-1710, 1996.

SHRAWAT, A. K.; LÖRZ, H. *Agrobacterium*-mediated transformation of cereals: a promising approach crossing barriers. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 4, n. 6, p. 575-603, 2006.
SNYMAN, S. J.; MEYER, G. M.; CARSON, D. L.; BOTHA, F. C. Establishment of embryogenic callus and transient gene expression in selected sugarcane varieties. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 62, n. 3, p. 151-154, 1996.

SNYMAN, S. J.; MEYER, G. M.; RICHARDS, J. M.; HARICHARAN, N.; RAMGAREEB, S.; HUCKETT, B. I. Refining the application of direct embryogenesis in sugarcane: effect of the developmental phase of leaf disc explants and the timing of DNA transfer on transformation efficiency. **Plant Cell Reports**, New York, v. 25, n. 10, p. 1016-1023, 2006.

SOMERS, D. A.; MAKAREVICH, I. Transgene integration in plants: poking or patching holes in promiscuous genomes? **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 15, n. 2, p. 126-131, 2004.

SOMERVILLE, C.; BROWSE, J.; JAWORSKI, J. G.; OHLROGGE, J. B. Lipids. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R (Ed.). **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. chap. 10, p. 456-527.

SONG, H.-J.; SHEDDON, A. A.; BARKER, P. A.; BESTWICK, C.; CHOE S.-N.; McCLITON, S.; GRANT, I.; ROTONDO, D.; HEYS, S. D.; WAHLE, K. W. J. Conjugated linoleic acid inhibits proliferation and modulates protein kinase C isoforms in human prostate cancer cells. **Nutrition and Cancer**, Philadelphia, v. 49, n. 1, p. 100-108, 2004.

SØRENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 115, n. 2, p. 113-128, 2005.

SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, New York, v. 98, n. 3, 503-517, 1975.

SRIVASTAVA, V.; VASIL, V.; VASIL, I. K. Molecular characterization of the fate of transgenes in transformed wheat (*Triticum aestivum* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 92, n. 8, p. 1031-1037, 1996.

STAM, M.; MOL, J. N. M.; KOOTER, J. M. The silence of genes in transgenic plants. **Annals of Botany**, Oxford, v. 79, n. 1, p. 3-12, 1997.

STEINHART, C. Conjugated linoleic acid: The good news about animal fat. **Journal of Chemical Education**, Easton, v. 73, n. 12, p. A302-A303, 1996.

STOGER, E.; WILLIAMS, S.; KEEN, D.; CHRISTOU, P. Molecular characteristics of transgenic wheat and the effect on transgene expression. **Transgenic Research**, London, v. 7, n. 6, p. 463-471, 1998.

STREATFIELD, S. J. Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 5, n. 1, p. 2-15, 2007.

SVAB, Z.; MALIGA, P. High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for chimeric *aadA* gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, n. 3, p. 913-917, 1993.

TANG, D.-C.; DeVIT, M.; JOHNSTON, S. A. Genetic immunization is a simple method of eliciting an immune response. **Nature**, London, v. 356, p. 152-154, 1992.

TAYLOR, P. W. J.; KO, H.-L.; ADKINS, S. W.; RATHUS, C.; BIRCH, R. G. Establishment of embryogenic callus and high protoplast yielding suspension cultures of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Boston, v. 28, n. 1, p. 69-78, 1992.

TAYLOR, P. W. J.; KO, H.-L.; ADKINS, S. W.; RATHUS, C.; BIRCH, R. G. Establishment of embryogenic callus and high protoplast yielding suspension cultures of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Boston, v. 28, p. 69-78, 1992.

TU, J.; ZHANG, G.; DATTA, K.; XU, C.; HE, Y.; ZHANG, O.; KHUSH, G. S.; DATTA, S. K. Field performance of transgenic elite commercial hybrid rice expressing *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. **Nature Biotechnology**, London, v. 18, p. 1101-1104, 2000.

UDVARDI, M. K.; CZECHOWSKI, T.; SCHEIBLE, W.-R. Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. **The Plant Cell**, Rockville, v. 20, n. 7, p. 1736-1737, 2008.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. 2009.
<http://www.unica.com.br/download.asp?mmdCode={0FF20FD0-4A93-4FDF-86FE-ABA32C7836EA}>. Acesso em: 30 out. 2009.

VAIN, P.; McMULLEN, M. D.; FINER, J. J. Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. **Plant Cell Reports**, New York, v. 12, p. 84-88, 1992.

van BEILEN, J. B.; POIRIER, Y. Production of renewable polymers from crop plants. **The Plant Journal**, Oxford, v. 54, n. 4, p. 684-701, 2008.

VASIL, I. K. A history of plant biotechnology: from the Cell Theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. **Plant Cell Reports**, New York, v. 27, n. 9, p. 1423-1440, 2008.

VERICA, J. A.; MAXIMOVA, S. N.; STREM, M. D.; CARLSON, J. E.; BAILEY, B. A.; GUILTINAN, M. J. Isolation of ESTs from cacao (*Theobroma cacao* L.) leaves treated with inducers of the defense response. **Plant Cell Reports**, New York, v. 23, n. 6, p. 404-413, 2004.

VETTORE, A. L.; SILVA, F. R. da; KEMPER, E. L.; ARRUDA, P. The libraries that made SUCEST. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 24, n. 1-4, p. 1-7, 2001.

VETTORE, A. L.; SILVA, F. R. da; KEMPER, E. L.; SOUZA, G. M.; SILVA, A. M. da; FERRO, M. I. T.; HENRIQUE-SILVA, F.; GIGLIOTI, E. A.; LEMOS, M. V. F.; COUTINHO, L. L.; NOBREGA, M. P.; CARRER, H.; FRANÇA, S. C.; BACCI JÚNIOR, M.; GOLDMAN, M. H. S.; GOMES, S. L.; NUNES, L. R.; CAMARGO, L. E. A.; SIQUEIRA, W. J.; VAN SLUYS, M.-A.; THIEMANN, O. H.; KURAMAE, E. E.; SANTELLI, R. V.; MARINO, C. L.; TARGON, M. L. P. N.; FERRO, J. A.; SILVEIRA, H. C. S.; MARINI, D. C.; LEMOS, E. G. M.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; TAMBOR, J. H. M.; CARRARO, D. M.; ROBERTO, P. G.; MARTINS, V. G.; GOLDMAN, G. H.; OLIVEIRA, R. C. de; TRUFFI, D.; ROSA, C. V. E. de; SIVIERO, F.; COSCRATO, V. E.; MACHADO, M. A.; GRIVET, L.; MAURO, S. M. Z. di; NOBREGA, F. G.; MENCK, C. F. M.; BRAGA, M. D. V.; TELLES, G. P.; CARA, F. A. A.; PEDROSA, G.; MEIDANIS, J.; ARRUDA, P. Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 13, p. 2725-2735, 2001.

VICKERS, J. E.; GROF, C. P. L.; BONNETT, G. D.; JACKSON, P. A.; KNIGHT, D. P.; ROBERTS, S. E.; ROBINSON, S. P. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic sugarcane results in darker juice and raw sugar. **Crop Science**, Madison, v. 45, p. 354-362, 2005.

VICKERS, J. E.; GROF, C. P. L.; BONNETT, G. D.; JACKSON, P. A.; MORGAN, T. E. Effects of tissue culture, biolistic transformation, and introduction of PPO and SPS gene constructs on performance of sugarcane clones in the field. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 56, n. 1, p. 57-68, 2005.

WANG, M.-L.; GOLDSTEIN, C.; SU, W.; MORRE, P. H.; ALBERT, H. H. Production of biologically active GM-CSF in sugarcane: a secure biofactory. **Transgenic Research**, London, v. 14, n. 2, p. 167-178, 2005.

WEI, H.; WANG, M.-L.; MOORE, P. H.; ALBERT, H. H. Comparative expression analysis of two sugarcane polyubiquitin promoters and flanking sequences in transgenic plants. **Journal of Plant Physiology**, New York, v. 160, n. 10, p. 1241-1251, 2003.

WENG, L.-X.; DENG, H.; XU, J.-L.; LI, Q.; WANG, L.-H.; JIANG, Z.; ZHANG, H. B.; LI, Q.; ZHANG, L.-H. Regeneration of sugarcane elite breeding lines and engineering of stem borer resistance. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 62, n. 2, p. 178-189, 2006.

WEST, D. B.; BLOHN, F. Y.; TRUETT, A. A.; DELANY, J. P. Conjugated linoleic acid persistently increases total energy expenditure in AKR/J mice without increasing uncoupling protein gene expression. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, n., p. 2471-2477, 2000.

WEST, D. B.; DELANY, J. P.; CAMET, P. M.; BLOHM, F. Y.; TRUETT, A. A.; SCIMECA, J. Effects of conjugated linoleic acid on body fat and energy metabolism in the mouse. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v. 268, n. 3, p. 267R-272R, 1998.

WIEGAND, B. R.; SPARKS, J. C.; PARRISH JUNIOR, F. C.; ZIMMERMAN, D. R. Duration of feeding conjugated linoleic acid influences growth performance, carcass traits and meat quality of finishing barrows. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 80, n. 3, p. 637-643, 2002.

WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION (United States). M. E. Cook; D. L. Stransky; M. W. Pariza. **Method for selectively altering body fat level, feed efficiency, or weight gain US 6020378**. 1 fev. 2000.

WU, L.; BIRCH, R. G. Doubled sugar content in sugarcane plants modified to produce a sucrose isomer. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 5, n. 1, p. 109-117, 2007.

YANG, M.; BOWER, R.; BUROW, M. D.; PATERSON, A. H.; MIRKOV, T. E. A rapid and direct approach to identify promoters that confer high levels of gene expression in monocots. **Crop Science**, Madison, v. 43, p. 1805-1813, 2003.

YE, G.-Y.; TU, J.; HU, C.; DATTA, K.; DATTA, S. K. Transgenic IR72 with fused Bt gene cry1Ab/cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* is resistant against four lepidopteran species. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 18, n. 2, p. 125-128, 2001.

YE, Z.; WANG, Z.-Y.; WU, X.; POTRYKUS, I.; SPANGENBERG, G. Transgenic Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) plants from microprojectile bombardment of embryonic suspension cells. **Plant Cell Reports**, New York, v. 16, n. 6, p. 379-384, 1997.

ZHANG, L.; XU, J.; BIRCH, R. G. Engineered detoxification confers resistance against a pathogenic bacterium. **Nature Biotechnology**, London, v. 17, p. 1021-1024, 1999.

ZHANGSUN, D.; LUO, S.; CHEN, R.; TANG, K. Improved *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of GNA transgenic sugarcane. **Biologia**, Bratislava, v. 62, n. 4, p. 386-393, 2007.

ZHENG, W.; WISE, M. L.; WYRICK, A.; METZ, J. G.; YUAN, L.; GERWICK, W. H. Polyenoic fatty acid isomerase from the marine alga *Ptilota filicina*: protein characterization and functional expression of the cloned cDNA. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 401, n. 1, p. 11-20, 2002.

ZUPAN, J. R.; ZAMBRYSKI, P. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 107, n. 4, p. 1041-1047, 1995.

APÊNDICES

APÊNDICE

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
           10      20      30      40      50
pGPAI  ACGTCGCATG CTCCCCCCCC GCNTTGGCGG CCGCGGGAAT TCGATTTCAGA
pai    -----

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
           60      70      80      90     100
pGPAI  CATATGTCCA TCTCGAAGNA TTCACGTATC GCCATCATCG GTGCTGGCCC
pai    ---ATGTCCA TCTCGAAGGA TTCACGTATC GCCATCATCG GGGCTGGCCC

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          110     120     130     140     150
pGPAI  GGCCGGGCTG GCTGCCGGA TGTACCTCGA ACAGGCCGGA TTTCACGACT
pai    GGCCGGGCTG GCTGCCGGA TGTACCTCGA ACAGGCCGGA TTTCACGACT

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          160     170     180     190     200
pGPAI  ACACGATCCT GGAACGCACC GACCACGTCG GAGGCAAGTG CCACTCACCG
pai    ACACGATCCT GGAACGCACC GACCACGTCG GAGGCAAGTG CCACTCACCG

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          210     220     230     240     250
pGPAI  AACTACCACG GCCGTCGTTA TGAGATGGGA GCCATCATGG GCGTCCCCAG
pai    AACTACCACG GCCGTCGTTA TGAGATGGGG GCCATCATGG GCGTCCCCAG

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          260     270     280     290     300
pGPAI  CTACGACACC ACTCAGGAGA TCATGAATCG CACCGGCGAC AAGGTCGACG
pai    TTACGACACC ATCCAGGAGA TCATGGATCG CACTGGCGAC AAGGTCGACG

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          310     320     330     340     350
pGPAI  GGCCGAAACT GCGTCGCGAG TTCCTGCACG AGGACGGCGA GATCTACGTC
pai    GGCCGAAACT GCGTCGCGAG TTCCTGCACG AGGACGGCGA GATCTACGTC

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          360     370     380     390     400
pGPAI  CCGGAAAAGG ATCCGATGCG TGGCCCGCAG GTTATGGCAG CAGTGCAGAA
pai    CCGGAAAAGG ATCCAGTGCG TGGTCCGCAG GTCATGGCAG CAGTGCAGAA

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          410     420     430     440     450
pGPAI  GCTGGGTCAG TTGCTCGCGA CGAAGTACCA GGGNATATGA CGCCAACGGC
pai    GCTGGGCCAG TTGCTCGCGA CGAAGTACCA GGGA-TATGA CGCCAACGGC

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      460      470      480      490      500
pGPAI  CACTACAACA AGGTTACGGA GGACCTCATG CTGCCCTTCG ACGAGTTCCT
pai    CACTACAACA AGGTTACGGA GGACCTCATG CTGCCCTTCG ACGAGTTCCT

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      510      520      530      540      550
pGPAI  CGCCTTCAAC GGGTGCGAGG CCGCCCGAGA CCTGTGGATC AACCCCTGCA
pai    CGCCTTCAAC GGGTGCGAGG CCGCCCGAGA CCTGTGGATC AACCCCTTCA

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      560      570      580      590      600
pGPAI  CAACCCCTCCC CCACGGGCAC GNCGACAAAAG ACCCCGCCCC CTAAGT-CTG
pai    CGGCCTTTCGG CTACGGGCAC TTCGACAACG TCCCGGCCGC CTACGTGCTG

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      610      620      630      640      650
pGPAI  A-GTACCT-G AATTTCGTCAC CA-GAT-TCC NTNGCCA-GG GAGATCNG-G
pai    AAGTACCTCG ACTTCGTCAC CATGATGTCC TTTGCCAAGG GAGATCTGTG

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      660      670      680      690      700
pGPAI  GACGTGG-CC GACGGCACCC AGGCAAT-TT CGAACACCTC AACGC-GCCC
pai    GACGTGGGCC GACGGCACCC AGGCGATGTT CGAGCACCTC AACGCCACCC

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      710      720      730      740      750
pGPAI  TGGAGCACCC GGCCGAAAGT AACGTT-ACA TCACTCGCAT CACCCGCGAG
pai    TGGAGCACCC GGCCGAACGC AACGTTGACA TCACTCGCAT CACCCGCGAG

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      760      770      780      790      800
pGPAI  -ACGGCAAGG -CCACATCCA CACCACGGAC TGG-ATCGCG AGTCCGACGT
pai    GACGGCAAGG TCCACATTCA CACCACGGAC TGGGATCGCG AGTCCGACGT

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      810      820      830      840      850
pGPAI  CCTCGTCCTC ACG--TCCGC TGGAAAAGTC CTC--ACTAC TC-GACCCG-
pai    CCTCGTCCTC ACCGTCCCGC TGGAAAAGTT CCTCGACTAC TCCGACGCGG

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      860      870      880      890      900
pGPAI  ACGAT-ACGA GCGGGATANT CTC---AAGA T-ATCC-CCA GCAGGA-ATG
pai    ACGATGACGA GCGGGAGTAC TTCTCGAAGA TCATCCACCA GCAGTACATG

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      910      920      930      940      950

```



```

pGPAI      GTGGAT-CCT GCCTGT--GA GGAGTACCCG AACATCGCTG GGCACAAAAC
pai        GTGGATGCCT GCCTGGTGAA GGAGTACCCG ACCATCTCCG GGTACGTCCC

          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          960      970      980      990      1000
pGPAI      CGACAAAAGG ACGCCCGAAC GNCACACCCA CGGCAGGGAT CACCAACACC
pai        CGACAACATG AGGCCCGAAC GTCTCGGGCA CGTCATGGTT TACTACCACC

          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          1010     1020     1030     1040     1050
pGPAI      ACCGCGCTGA TGATCCGCAC CAGATCATCA CGACCTACCT GCTACGTAAC
pai        GCTGGGCTGA TGATCCGCAC CAGATCATCA CGACCTACCT GCTACGTAAC

          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          1060     1070     1080     1090     1100
pGPAI      CATCCGGACT ACGCGGACAA GACTCAGGAG GAGTGCCGCC AGATGGTCTT
pai        CATCCGGACT ACGCGGACAA GACTCAGGAG GAGTGCCGCC AGATGGTCTT

          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          1110     1120     1130     1140     1150
pGPAI      CGACGACATG GAGACCTTCG GTCATCCGGT CGAGAAGATC GTNCGAGGAG
pai        CGACGACATG GAGACCTTCG GTCATCCGGT CGAGAAGATC ATC-GAGGAG

          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          1160     1170     1180     1190     1200
pGPAI      CAGACCTGGT ACTACTTCCC GCACGTTAGC TCGGAGGACT ANCAAGGCCG
pai        CAGACCTGGT ACTACTTCCC GCACGTTAGC TCGGAGGACT AC-AAGGCCG

          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          1210     1220     1230     1240     1250
pGPAI      GATGGTACGA GAAGGTCGAG GGAATGCAGG GTCGTCGCAA CACCTTCTAC
pai        GGTGGTACGA GAAGGTCGAG GGAATGCAGG GTCGTCGCAA CACCTTCTAC

          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          1260     1270     1280     1290     1300
pGPAI      GCCGGAGAAA TTATGAGTTT CGGTAATTTT GACGAGGTGT GCCACTACTC
pai        GCCGGAGAAA TTATGAGTTT CGGTAATTTT GACGAGGTGT GCCACTACTC

          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          1310     1320     1330     1340     1350
pGPAI      GAAGGACCTG GTGACGCGGT TCTTCGTGTG ACNCGTAGAT GGAATCACTN
pai        GAAGGACCTG GTGACGCGGT TCTTCGTGTG A-----

          ....|...

pGPAI      AGTGAATT
pai        -----

```