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

Transformação genética de cana-de-açúcar e validação de genes de referência para avaliação do número de cópias inseridas por PCR em tempo real

Tânia Regina Batista

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

**Piracicaba
2016**

Tânia Regina Batista
Bacharel em Ciências Biológicas

**Transformação genética de cana-de-açúcar e validação de genes de referência
para avaliação de número de cópias inseridas por PCR em tempo real**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Profa. Dra. **HELAINÉ CARRER**

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

Piracicaba
2016

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

Batista, Tânia Regina

Transformação genética de cana de açúcar e validação de genes de referência para avaliação do número de cópias inseridas por PCR em tempo real / Tânia Regina Batista. -- versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. -- Piracicaba, 2016. 101 p. : il.

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

1. Transgênicos 2. Cultura de tecidos 3. luz LED 4. *xth* 5. *AtDdm1* I. Título

CDD 633.61
B333t

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram com a minha aquisição conhecimento nestes anos de doutorado.

À meus pais, Marco e Valéria, irmãos Thaís e Marco Túlio, e familiares que me incentivaram, acalmaram e entenderam minha ausência por todos esses anos.

Ao Cleber por me incentivar e apoiar em todos os momentos desse caminho.

Ao Programa de Fisiologia e Bioquímica de plantas pela oportunidade e aperfeiçoamento, especialmente à Solizete que sempre foi muito prestativa e carinhosa em todos os momentos.

À coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Agradeço à Prof^a Dr^a Helaine Carrer pela disponibilidade na orientação e pelas oportunidades de incremento de conhecimento oferecidas.

À querida Fátima por todos os momentos de carinho, compreensão, amizade e companheirismo, dentro e fora do laboratório. Todos seus ensinamentos de vida e trabalho nunca serão esquecidos.

Aos queridos amigos Ana Paula Preczenhak e Flávio Santos pela amizade e momentos de descontração que fizeram desta caminhada mais leve divertida e proveitosa.

Aos amigos do CEBTEC, Guilherme, André, Esteban, Ênio, Martha, Tarcísio, Nuno, Jeferson, Ana Paula Jacobus, Aline Borges, Aline Politano, Jéssica e Fernando.

Às queridas amigas/irmãs Carol, Sylvia, Marcela e Letícia. Obrigada por dividirem comigo além do teto, muitas conversas, companheirismo e amizade!

Obrigada aos amigos Denis, Flávia, Matheus, Sheron, Érika, , Renata, Raquel, Sandra, Élcio, Leonardo, Marcelo, Laura, e Tatiana com vocês esta caminhada foi mais divertida!

Aos amigos de muitos anos que mesmo longe estão sempre me apoiando, Marinês, Mara, Jean, Raquel, Josiane, Letícia, Juliana, Flávia, Vanessa, Evânia e Breno

Ao IPEF, principalmente à Vânia, Alciméia, Silvia e Israel, por proporcionar mais uma oportunidade de crescimento no fim da minha jornada.

À todos que participaram deste tempo tão proveitoso, de crescimento intelectual, profissional e principalmente pessoal em minha vida, a presença de cada um tornou essa jornada inesquecível!

OBRIGADA!!!

EPÍGRAFE

"E guardemos a certeza pelas dificuldades já superadas que não há mal que dure para sempre"

Chico Xavier

Sem Mandamentos

Hoje eu quero a rua cheia de sorrisos francos
De rostos serenos, de palavras soltas
Eu quero a rua toda parecendo louca
Com gente gritando e se abraçando ao sol
Hoje eu quero ver a bola da criança livre
Quero ver os sonhos todos nas janelas
Quero ver vocês andando por aí
Hoje eu vou pedir desculpas pelo que eu não disse
Eu até desculpo o que você falou
Eu quero ver meu coração no seu sorriso
E no olho da tarde a primeira luz
Hoje eu quero que os boêmios gritem bem mais alto
Eu quero um carnaval no engarrafamento
E que dez mil estrelas vão riscando o céu
Buscando a sua casa no amanhecer
Hoje eu vou fazer barulho pela madrugada
Rasgar a noite escura como um lampião
Eu vou fazer seresta na sua calçada
Eu vou fazer misérias no seu coração
Hoje eu quero que os poetas dancem pela rua
Pra escrever a música sem pretensão
Eu quero que as buzinas toquem flauta-doce
E que triunfe a força da imaginação

(Oswaldo Montenegro)

SUMARIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
1 Introdução	13
1.1 Objetivos.....	16
2.Revisão Bibliográfica.....	17
2.1 Cana-de-açúcar	17
2.2 Cultura de tecidos.....	18
2.3 Qualidades de luz	19
2.4 Transformação genética	21
2.5 Gene <i>Ddm1</i>	22
2.6 O gene <i>xth</i>	24
2.7 PCR em tempo real	26
2.8 Genes de referência	28
Referencias	29
3. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE CANA-DE-AÇÚCAR COM OS GENES <i>AtDdm1</i> E <i>xth</i>	39
Resumo.....	39
Abstract.....	39
3.1 Introdução.....	40
3.2 Material e métodos	42
3.2.1 Local dos experimentos e Material Vegetal.....	42
3.2.2 Inoculação de material e obtenção de calos	42
3.2.3 Exposição às diferentes qualidades de luz	43
3.2.4 Teste de resistência à concentrações de geneticina.....	44
3.2.5 Transformação genética com os genes <i>Ddm1</i> e <i>xth</i>	45
3.2.6 Extração de DNA.....	48
3.2.7 Averiguação de plantas transgênicas.....	49
3.3 Resultados e discussão	50
3.3.1 Exposição às diferentes qualidades de luz	50
3.3.2 Teste de resistência à concentrações distintas de geneticina.....	55
3.3.3 Transformação genética com o gene <i>AtDdm1</i>	61
3.3.4 Transformação genética com o gene <i>xth</i>	63
3.4 Conclusões	67

Referências.....	68
4. VALIDAÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA PARA DETECÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS INSERIDAS POR PCR EM TEMPO REAL.....	71
Resumo.....	71
Abstract.....	71
4.1 Introdução.....	72
4.2 Material e Métodos	73
4.2.1 Local dos experimentos e variedades utilizadas	73
4.2.2 Citometria de fluxo para análise de tamanho do genoma	73
4.2.3 Validação de genes de referência.....	74
4.2.4 Cálculo do número de cópias inseridas.....	77
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
4.3.1 Citometria de fluxo para análise do tamanho e estabilidade do genoma	78
4.3.2 Validação de genes de referência.....	79
4.3.3 Quantificação dos genes xth inseridos no genoma de cana-de-açúcar da variedade SP803280.....	85
4.3.3 Quantificação dos genes <i>AtDdm1</i> inseridos no genoma de cana-de- açúcar da variedade SP803280	89
4.3.4 Quantificação dos genes <i>neo</i> inseridos no genoma de cana-de- açúcar da variedade RB835089.....	92
4.4 Conclusões	95
Referências.....	96
5. Considerações Finais.....	97
Referências.....	101

RESUMO

Transformação genética de cana-de-açúcar e validação de genes de referência para avaliação de número de cópias inseridas por PCR em tempo real

Atualmente a procura por produtos sustentáveis têm-se mostrado cada vez mais frequente e promissora. Em espécies de importância comercial, procura-se obter a maior produtividade possível dentro de um curto espaço de tempo aliado à preservação do meio ambiente. Dentro disso, a transformação genética de plantas se mostra uma alternativa atrativa para a geração de variedades de cana-de-açúcar que gerem produtos de maneira mais eficaz. O sucesso da transformação genética está diretamente associada a cultura de tecidos de plantas que precisa ser adequada a cada genótipo e situação de cultivo, sendo a luminosidade um dos principais fatores para a produção de plantas vigorosas. Outro fator importante é a seleção das plantas transgênicas, que precisam ser submetidas a uma quantidade de agente seletivo suficiente para identificar as plantas modificadas geneticamente. Em cana-de-açúcar, a identificação de plantas transgênicas por PCR e a definição do número de cópias é um procedimento de difícil execução e muito oneroso. Isto se dá pois no processo transformação via biolística, a inserção de genes é aleatória, produzindo plantas com variados números de cópias. Em consideração a estes fatores envolvidos na eficiência de obtenção de plantas transgênicas de cana-de-açúcar, os objetivos deste trabalho foram o aperfeiçoamento do protocolo de cultura de tecidos, transformação genética da variedade SP803280 com os genes *xth*, *AtDdm1*, como também, definir genes de referência para a quantificação do número de cópias dos genes *xth* e *AtDdm1* inseridos na variedade SP803280 e do gene *neo* na RB835089, análise de ploidia e tamanho de genoma dos eventos transgênicos comparado com as plantas controle. No estudo a respeito da melhor qualidade de luz durante o cultivo *in vitro* na fase de regeneração de plantas, tem-se que a luz branca e a junção das luzes LED e branca se mostraram melhores para regeneração e desenvolvimento das plantas enquanto que para plântulas, as luzes LED e branca separadamente foram mais efetivas no crescimento. Para a seleção das plantas uma concentração de geneticina entre 40 e 50 mgL⁻¹ é recomendada. As taxas de sucesso nas transformações genéticas para o gene *xth* variaram entre 2,5 a 18,3% dependendo do experimento e para *AtDdm1* foi de 2,2% em um bombardeamento. Não houveram alterações de ploidia e tamanho do genoma nos transgênicos das duas variedades em relação à planta selvagem. Os genes *p4h* e *prr* foram identificados como os melhores para a quantificação relativa de genes inseridos por PCR em tempo real na variedade SP803280 enquanto que para a RB835089 *aprt* e *prr* se mostraram mais eficazes. A análise do número de cópias inseridas em eventos transgênicos por PCR em tempo real foi possível através das duas metodologias de cálculo testados por este trabalho, com resultados que concordam com uma tendência nesta determinação de maneira simples e rápida.

Palavras-chave: Transgênicos; Cultura de tecidos; Quantificação de número de cópias; luz LED; *xth*; *AtDdm1*

ABSTRACT

Genetic transformation of sugarcane and validation of reference genes for evaluation of the number of copies inserted by real-time PCR

Currently the demand for sustainable products has been shown to be frequent and promising. In species of commercial importance, there is an effort to obtain the highest possible productivity in a short time, along with the environment preservation. In this context, genetic transformation of plants appears as an attractive alternative for the development of sugarcane varieties able to generate products in a more effective way. The genetic transformation success is directly associated to plant tissue culture that requires specific condition for each genotype and cultivation process, in which, luminosity is one of the main factors that determines the production of vigorous plants. Another important factor is the selection of transgenic plants, that occur by exposing plants to a sufficient amount of selective agent in order to identify only genetic modified plants. In sugarcane, identification of transgenic plants by PCR and the definition of copy numbers is a difficult procedure to implement and usually is very costly. It is because in the process of genetic transformation by biolistic, the insertion of genes occurs randomly and also produce plants with varied copy numbers. In consideration of these factors directly involved in the efficiency to obtain sugarcane transgenic plants the objectives of this study were the improvement of a tissue culture protocol, the genetic transformation of the variety SP803280 with *xth* and *AtDdm1* genes. Also, the studies include the definition of reference genes for determining the number of copies inserted of *xth* and *AtDdm1* genes into the variety SP803280 and *neo* gene in RB835089, ploidy analysis and genome size of the transgenic events compared to control plants. In the study related to the best light quality for *in vitro* plant regeneration, white light and the combination of LED and white lights proved to be better for plants regeneration and development while for seedlings, LED and white light separately were more effective for growth. In order to obtain selection of transgenic plants, geneticin concentration between 40 and 50 mg L⁻¹ is recommended. Success rates in *xth* genetic transformation ranged from 2.5 to 18.3% depending on the experiment, and for *AtDdm1* was only 2.2% in just one biolistic bombardment. There were no changes in ploidy and genome size in transgenic events related to their wild type plant. The genes *p4h* and *prp* were defined to be the best for determining the copy number of transgenic events by real time PCR in SP803280 variety, while for RB835089, the genes *aprt* and *prp* were the most effective. The analysis of the number of inserted copies was possible using the two calculation methodologies tested by this work, with results that agree with a tendency in a simple and fast quantification methodology.

Keywords: Transgenics; Plant tissue culture; Gene copy number; LED light; *xth*; *AtDdm1*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANA	Ácido naftaleno acético
BAP	6-benzilaminopurina
2,4-D	Ácido 2,4 diclorofenoxiacético
MS	Murashige e Skoog
mg.L ⁻¹	Miligramas por litro
<i>P4H</i>	Prolyl 4-hydroxylase
<i>ENOL</i>	<i>Enolase</i>
<i>TST</i>	Thiosulfato sulfurtransferase
<i>APRT</i>	Antranilato fosforybosyltransferase
<i>CYC</i>	Ciclina
<i>PRR</i>	Pseudo regulador de resposta
CTAB	Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide
Ubi-1	Promotor derivado do gene da ubiquitina de milho
T-nos	Terminador derivado do gene nopalina sintase
Ct	Cicle threshold
cDNA	DNA complementar
18SRNA	18S RNA ribossomal
ACT	Actina
TUB	Tubulina
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
UBQ	Poliubiquitina
EF1 α	Factor de alongamento 1 α
DNA	Ácido desoxiribonucléico
XEH	Xiloglucano hidrolase
XET	Xiloglucano endotransglucosilase
mRNA	RNA mensageiro
RNA	Ácido ribonucleico
LTR	Retrotransposons de terminação longa
CO ₂	Dióxido de carbono
qRT-PCR	PCR em tempo real

PCR	Reação em cadeia da polimerase
XTH	Xiloglucano endotransglucosilase-hidrolase
Ddm1	Decrease in DNA metilation

1 Introdução

Tendo em vista a grande importância da cultura de cana-de-açúcar na atualidade principalmente quando se trata da produção de fontes de energia alternativas e sustentáveis, pesquisas na área de biologia molecular têm o potencial de produzir plantas transgênicas com características importantes para o aumento de produtividade.

No desenvolvimento dos protocolos de transformação genética de plantas a cultura de tecidos é uma ferramenta indispensável e precisa ser adaptada ao genótipo utilizado nos experimentos. Condições de luminosidade afetam significativamente o desenvolvimento *in vitro* das plantas. Atualmente com o desenvolvimento de tecnologias de iluminação cada vez mais baratas e eficientes, é possível controlar e aumentar o vigor das plantas apenas alterando a fonte de luz a que estão submetidas.

Especificamente para cana de açúcar da variedade SP803280 não há até o momento relatos na literatura acerca das condições de cultivo mediante à diferentes qualidades de luz na regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos e discos foliares. Geralmente a luz fluorescente branca com espectro de comprimentos de onda variando entre 400 e 680 nm é utilizada na maior parte das salas de crescimento. Contudo, nos últimos anos houve o surgimento da tecnologia de luzes LED que além de mais duráveis e energeticamente econômicas, emitem um espectro mais específico nos comprimentos de onda fotossinteticamente ativos da ordem de 400 e 700 nm, proporcionando uma melhor utilização da luz pelas plantas durante o cultivo *in vitro*.

Outra etapa importante nos procedimentos e que precisa ser adequada a cada genótipo é a seleção das plantas transgênicas, pois cada uma possui grau de resistência diferente, sendo necessária uma maior ou menor quantidade de agente seletivo no meio de cultura. Este critério é essencial para que somente plantas transgênicas possam se desenvolver evitando gastos de tempo e dinheiro com materiais não promissores. A etapa de seleção de plantas com agente seletivo geneticina é específica de cada variedade e acontece após os procedimentos de transformação genética com o

gene *neo*, que permite o crescimento de plantas que são resistentes a este antibiótico.

A tecnologia de transformação genética de cana-de-açúcar também traz a preocupação quanto à estabilidade dos transgenes, considerando como entraves principalmente o tamanho do genoma, poliploidia e presença de elementos transponíveis. Além da genética complexa, o processo de obtenção de transgênicos em cana-de-açúcar é relativamente demorado e passa pela fase de embriogênese somática o que proporciona o aumento de atividade de transposons com potencial de induzir variabilidade no genoma vegetal, o que não é favorável para a manutenção de características de interesse.

Neste sentido o gene *AtDdm1*, bem caracterizado como atuante na manutenção da metilação do DNA, levaria ao aumento da estabilidade do genoma pela inativação de elementos transponíveis (HIGO et al., 2012). Estes são presentes em grande quantidade no genoma da cana de açúcar e levam a uma maior instabilidade e complexidade (ARAUJO et al., 2005). Em trabalhos anteriores a inserção deste gene na variedade RB835486 levou a uma menor expressão, analisada por PCR quantitativo, de elementos de transposição (PICELLI, 2010). Em pólen de *Arabidopsis thaliana*, elementos transponíveis são reativados pela falta da proteína DDM1 (REBOLLO; ROMANISH; MAGER, 2011).

Em cana, a transgenia permite também a inserção de genes envolvidos em processos metabólicos de interesse, como o aumento de biomassa. Neste sentido, a superexpressão do gene *xth*, que codifica para enzimas xiloglucano transglucosidase/hidrosilase envolvida na extensão da parede celular, tem o potencial de levar a um incremento de biomassa e crescimento acelerado das plantas, aumentando sua produtividade. Em *Arabidopsis thaliana* a superexpressão de *xth* deu origem a plantas mais flexíveis e com o crescimento acentuado de hipocótilos quando comparadas às selvagens (MIEDES et al., 2013). Este aumento dos polissacarídeos de parede celular em cana-de-açúcar poderia gerar um incremento na geração de etanol de segunda geração o que proporcionaria uma menor competição entre a geração de biocombustíveis e alimento.

Um dos problemas frequentemente encontrados durante o processo de análise de plantas transgênicas de cana-de-açúcar é a obtenção do número de cópias do gene de interesse inseridas no genoma. A técnica de *southern blot* por sondas não radiativas que é amplamente utilizada para outras espécies é de difícil aplicação para cana-de-açúcar pois o tamanho e complexidade do genoma torna o procedimento impreciso levando muitas vezes ao insucesso. A técnica consiste na extração do DNA da planta transgênica seguido de digestão com enzimas de restrição e hibridização com uma sonda específica para o gene inserido. Porém, no caso de cana-de-açúcar este procedimento se mostra por muitas vezes ineficaz não produzindo resultados satisfatórios, gerando resultados negativos ou hibridizações inespecíficas.

Assim, o desenvolvimento de métodos que sejam mais rápidos e confiáveis para a averiguação do número de cópias inseridas é necessário. A técnica de PCR em tempo real é uma alternativa que têm sido utilizada para este fim em diversas espécies, no caso de cana de açúcar há dois métodos descritos: o primeiro gera um índice de número de cópias (GCI), o qual se baseia na relação entre um gene de referência e o gene inserido (CASU; SELIVANOVA; PERROUX, 2012). O segundo foi utilizado para a verificação do número de cópias de genes endógenos e é uma quantificação absoluta baseada em relações de tamanho e peso do genoma (XUE et al., 2014), foi proposta a utilização deste também na verificação do número de cópias inseridas de genes de interesse. Ambas as maneiras são baseadas em dados de eficiência e CT produzidos pelo experimento de PCR em tempo real.

Porém, para o uso do qRT-PCR é necessário uma etapa de normalização. A abordagem mais aceita é a de incluir um ou um pequeno número de genes de referência (os genes de controle interno), cuja expressão é presumida estável (SINTON; FINLAY; LYNCH, 1999; GUÉNIN et al., 2009; ZHU et al., 2013; HAN et al., 2015). Para a avaliação do número de cópias estes necessitam ser genes de baixo número de cópias dentro do genoma, preferencialmente cópia única (XUE et al., 2014). Pois, para a geração de um índice comparando o gene de interesse ao de referência, quanto mais próximo este estiver de ser único, mais próxima da realidade será a quantificação do

número real de cópias. Especificamente em se tratando da quantificação de cópias inseridas, em que o DNA é utilizado como molde para as reações de PCR, os genes de referencia ainda precisam ter uma amplificação próxima com a do gene alvo, geralmente entre 25 e 30 ciclos (ISKANDAR et al., 2004; CASU; SELIVANOVA; PERROUX, 2012). É necessária a validação e quantificação em varias variedades como as SP803280 e RB835089 que foram utilizadas nos procedimentos relativos a este trabalho.

Deste modo, para que o processo de transformação genética de cana-de-açúcar tenha o sucesso pretendido, adequações no protocolo e definições dos padrões a serem utilizados precisaram ser estabelecidos.

1.1 Objetivos

Este projeto teve como objetivo a obtenção dos eventos transgênicos de cana-de-açúcar para o gene *AtDdm1* e *xth* e a avaliação do número de cópias inseridas. Para tanto, os objetivos específicos foram:

- 1) Avaliação das melhores condições de luminosidade para o cultivo *in vitro* de plantas da variedade SP803280.
- 2) Avaliação das condições de seleção das plantas da variedade SP803280.
- 3) Transformação genética de calos de cana-de-açúcar da variedade SP803280 com os genes *AtDdm1* e *xth*
- 4) Identificação de inserção dos genes *AtDdm1* e *xth* no genoma da cana por PCR;
- 5) Avaliação da ploidia e tamanho de genoma por citometria de fluxo;
- 6) Validação dos genes de referência nas variedades RB835089 e SP803280;
- 7) Avaliação do número de cópias inseridas por qRT-PCR.

2.Revisão Bibliográfica

2.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) foi introduzida no Brasil em 1532 e sempre teve grande importância econômica para o país na produção de açúcar e mais recentemente na de etanol. Pertencente à família Poaceae e ao gênero *Saccharum*, possui cerca de 10 espécies, e muitos híbridos derivados de cruzamentos interespecíficos. Os cultivares de importância comercial, ou seja, que apresentam características agrônomicas e industriais favoráveis são os obtidos dos cruzamentos entre *S. officinarum*, *S. spontaneum*, e *S. robustum* em programas de melhoramento genético convencional (SUPRASANNA et al., 2011).

Segundo levantamento da Companhia Nacional de Abastecimento (2015), o Brasil é o maior produtor mundial de açúcar e etanol derivado de cana-de-açúcar e também possui a maior área plantada seguido por Índia e China. A safra 2015/16 é de aproximadamente 8.995,5 mil hectares. Sendo que o estado de São Paulo possui 52% do total de área plantada, respondendo por cerca de 50% do total de produção de álcool e 87,5% de açúcar, juntamente com os estados do Centro-sul.

A cana-de-açúcar é um importante produto agrícola utilizado como fonte de alimento, biomassa e biocombustível, considerado como uma das principais e mais rentáveis fontes de etanol (MANNERS; CASU, 2011). O cenário mundial encontra-se bastante favorável no que diz respeito à comercialização de derivados de álcool e açúcar, o que impulsiona o desenvolvimento do setor sucroalcooleiro no Brasil.

O papel ambiental desempenhado pela cultura da cana também é muito importante, uma vez que o etanol, é uma das melhores alternativas para redução da emissão de gases causadores do efeito estufa, haja vista que a sua queima como combustível reduz em 70% a emissão de CO₂ na atmosfera em relação à gasolina (CONAB, 2015)

No âmbito científico e tecnológico, a cana-de-açúcar encontra entraves principalmente quando se trata do melhoramento genético da espécie,

pois, sua a poliplóide, o grande tamanho do genoma, a presença de elementos transponíveis além de complexas interações ambientais fazem do melhoramento genético convencional um processo que exige além de muito tempo na seleção de progênies, uma grande demanda de recursos (MANICKAVASAGAM et al., 2004).

Neste cenário, a biotecnologia com a utilização de técnicas de cultura de tecidos aliadas a transformação genética no melhoramento da espécie é uma alternativa com potencial de auxiliar na geração de conhecimento com aplicação em áreas relacionadas à produção de açúcar e bioenergia no Brasil.

2.2 Cultura de tecidos

Nas últimas décadas a embriogênese somática foi desenvolvida com o intuito de propiciar uma rápida multiplicação de inúmeras espécies, e, passou a ser utilizada não somente com fins científicos, mas também com interesse industrial (PINTO et al., 2011). Atualmente, figura como uma das técnicas de maior interesse e pode ser entendida como um conjunto de etapas pelas quais células somáticas diferenciam-se em embriões, o processo que ocorre a partir de explante somático, se assemelha morfológicamente ao que ocorre com embriões zigóticos (GEORGE; HALL, 2008), podendo ser empregado para estudos de desenvolvimento embrionário e para propagação vegetativa em larga escala.

Para a transformação genética de cana-de-açúcar, a embriogênese somática é a técnica mais utilizada, pois proporciona a obtenção de um grande número de plantas. Para isto, a auxina mais utilizada é o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), a regulação do processo ocorre provavelmente através do estabelecimento de um gradiente de auxina durante a fase de indução, que é essencial para dar início simetria bilateral durante a embriogênese somática e zigóticas tanto em dicotiledoneas como em monocotiledoneas (JIMÉNEZ, 2005).

Entretanto, em virtude de sucessivo cultivo *in vitro* em meio de cultura contendo reguladores de crescimento para induzir formação de calos

embriogênicos, as plantas regeneradas neste sistema podem apresentar variações somaclonais. Segundo Lakshmanan, (2006), esta variabilidade genética induzida por cultura de tecidos, é indesejada para a manutenção de germoplasma, propagação comercial e transformação genética.

2.3 Qualidades de luz

O sucesso da transformação genética de plantas está intrinsecamente ligado à oferecer condições ótimas para o cultivo *in vitro*. Na regeneração e crescimento das mudas um dos principais fatores limitantes é a qualidade da luz, que influencia as características morfológicas e fisiológicas da planta. Controlar o comprimento de onda, a quantidade de fluxo de fótons e o fotoperíodo permite o ajuste do alongamento de hastes, o período de floração, acumulação de biomassa e qualidade nutricional além de ser particularmente crítico para o crescimento (JEONG et al., 2012).

Fontes de luz como fluorescentes, metal halide, sódio de alta pressão e incandescentes são geralmente utilizadas em casas de vegetação e salas de crescimento de plantas. Entretanto estas fontes tem desvantagens como baixo fluxo de fótons fotossinteticamente ativos, assim como limitado período de operação, baixo rendimento quântico e espectro de comprimentos de onda reduzidos (ILIEVA et al., 2010).

Nos anos de 1990, as luzes LED (light-emitting diode) foram investigadas pela primeira vez em relação com o desenvolvimento de plantas (BULA et al., 1991) e foi demonstrado que são uma eficiente alternativa para os sistemas tradicionais, anteriormente utilizados (MORROW, 2008). Em comparação com o sistema convencional as características melhoradas incluem o menor tamanho e peso, longo período de utilização, baixa emissão de temperatura, especificidade no comprimento de onda e o menor consumo de energia comparadas as outras fontes (BULA et al., 1991; MASSA et al., 2010).

A irradiação com LED em comprimentos de onda determinados no procedimento de cultura de tecidos de plantas se mostrou vantajosa substituindo as lâmpadas fluorescentes como fontes de luz. Energeticamente

mais eficiente as LEDs podem ser usadas em salas de crescimento e supostamente podem melhorar a produção vegetal. É possível regular e controlar os aspectos fisiológicos e de crescimento da planta, tais como a fotossíntese e/ou fotomorfogênese.

A flexibilidade na fabricação de painéis de LED mistos com diferentes picos de emissão pode proporcionar uma emissão espectral com potencial para aumentar o crescimento ou determinada resposta fisiológica (DUTTA GUPTA; JATOTHU, 2013).

Adicionalmente, os comprimentos de onda específicos com um espectro definido tornam as LEDs precisas tanto em qualidade quanto em intensidade de luz (FOLTA et al., 2005; MASSA et al., 2010). Os efeitos fisiológicos e morfológicos tem sido estudados para uma grande variedade de plantas como batata (JAO et al., 2005), espinafre, rabanete e alface (YORIO et al., 2001), morangos (YANAGI et al., 2006), e *Arabidopsis* (ZHANG; MARUHNICH; FOLTA, 2011). estes têm demonstrado que a qualidade da luz influencia a eficiência biológica dos fitorreguladores adicionados ao meio de cultura, bem como o balanço hormonal nos tecidos. Conseqüentemente, a qualidade da luz surge como uma ferramenta na manipulação da indução de balanços fisiológicos favoráveis a respostas específicas no crescimento das plantas (Morini & Muleo, 2003). Sendo que a eficiência na absorção de luz no comprimentos de onda azul e vermelho principalmente levam à diferentes padrões no desenvolvimento das plantulas, aumentando o número de brotações e/ou o tamanho destas.

Investigações acerca da qualidade de luz artificial influenciando na cultura de tecidos de cana-de-açúcar são raras, um estudo apenas indica que a junção entre luzes LED nos comprimentos de onda azul e vermelho desempenham um papel importante na quantidade de massa fresca, comprimento e multiplicação das brotações de mudas cultivadas *in vitro* na variedade RB92579 (SILVA et al., 2014).

2.4 Transformação genética

Muitos trabalhos de sucesso com o intuito de se adequar protocolos visando a transformação genética já foram relatados para cana-de-açúcar (JOYCE et al., 2010; BASNAYAKE; MOYLE; BIRCH, 2011; TAPARIA; FOUAD; GALLO, 2012), estes priorizam genes relacionados ao aumento de quantidade de biomassa ou apenas ao procedimento de seleção dos transgenes com a inserção de apenas genes de seleção. A transgenia têm sido utilizada com diversos propósitos, mas principalmente visando o aumento de produtividade. Porém, em contraste com muitas outras gramíneas, a cultura de tecidos e as respostas de transformação de cana são genótipo dependentes (RANI; SANDHU; GOSAL, 2012).

Dentre as técnicas comumente utilizadas na transformação genética, a transferência direta de genes em cana-de-açúcar por meio de bombardeamento partículas é rotina em cultivares que respondem bem à embriogênese somática, cultura de calos e regeneração de plantas. O processo é eficiente, produzindo dezenas de eventos de plantas transgênicas independentes (SINGH et al., 2013). Porém, a melhoria genética por esta via depende da capacidade de se transformar cultivares elite sem alterar negativamente suas características comerciais pré-existentes, o que pode ocorrer pois no procedimento de transformação genética os genes são inseridos aleatoriamente.

Apesar da transformação genética em cana-de-açúcar ser uma alternativa viável para a geração de variedades mais rentáveis, o processo de obtenção de transgênicos pode encontrar alguns empecilhos no que diz respeito à manutenção do gene inserido (BOWER; BIRCH, 1992; BOWER et al., 1996). Considera-se que a atividade de elementos transponíveis seja um fator relevante que pode contribuir para a instabilidade dos transgenes. Técnicas de cultivo *in vitro* fazem parte do processo de obtenção de transgênicos, mas o período e a manipulação dos materiais causam a ativação de transposons que proporcionam instabilidade no genoma da cana e dificultam o processo de estabilidade dos genes inseridos (PICELLI, 2010).

2.5 Gene *Ddm1*

A variabilidade genética indesejada em cultura de tecidos já foi relatada em diversos trabalhos e geralmente é associada à atividade de elementos de transposição que tornam-se móveis em condições de cultivo *in vitro* (HIROCHIKA; OKAMOTO; KAKUTANI, 2000), podendo acarretar mudanças críticas no genoma vegetal pela alteração dos padrões e funções gênicas.

Quanto às modificações relativas à atividade de transposons, estes são controlados pela hipermetilação de citosinas e pelo empacotamento e remodelagem de cromatina que alteram a acessibilidade das transposases à maquinaria transcricional (RANGWALA; RICHARDS, 2007).

Em trabalho realizado por Araujo et al., (2005), foram identificados, em cana-de-açúcar, 68 elementos de transposição os quais foram agrupados em 11 famílias, estes mostraram ainda que dentre os mais ativos estavam os LTR retrotransposons da família *Hopscotch*, sendo que essa atividade concentrava-se preferencialmente em células de calos, que são a principal fonte de células embriogênicas empregadas na transformação genética de cana-de-açúcar. Um grande número de cópias de retrotransposons no genoma e sua freqüente localização perto de genes tem um alto impacto na transcrição de elementos transponíveis e na expressão gênica (VICIENT, 2010).

Uma importante via de regulação ao nível transcricional está orientada pelo gene *Decrease in DNA methylation* - DDM1 (TSUKAHARA et al., 2009) este, codifica para um fator de transcrição para remodelamento de cromatina do tipo SWI2/SNF2. Em *Arabidopsis thaliana* é um dos mais bem caracterizados reguladores epigenéticos, ele é necessário para a manutenção da metilação da citosina no DNA genômico (HIGO et al., 2012).

A herança de mudanças epigenéticas é especialmente bem documentada em plantas, onde a metilação do DNA é estavelmente mantida por mitose e meiose (LAW; JACOBSEN, 2011). Em *Arabidopsis*, a proteína DNA METIL TRANSFERASE 1 (MET1) e o fator de remodelação de cromatina

DECREASE IN DNA METHYLATION 1 (DDM1) são essenciais para a manutenção global de metilação do DNA como mostrado por toda a hipometilação do genoma que ocorre em mutantes para os dois genes. Muitos desses loci hipometilados são herdados por muitas gerações, mesmo após a reintrodução de uma MET1 funcional ou alelo DDM1 (JOHANNES et al., 2009; REINDERS et al., 2009; IWASAKI, 2015).

A análise in silico do gene *Ddm1* de *A. thaliana* (*AtDdm1*) e o alinhamento com as sequências de alguns membros pertencentes a família Poaceae foi realizada em trabalho anterior (PICELLI, 2010), no intuito de gerar informações para caracterização molecular e identificação da proteína DDM1. Comparou-se a proteína de *Arabidopsis* com as sequências de cana-de-açúcar, sorgo, milho e arroz, a fim de determinar a escolha do gene mais adequado para transformação genética de cana-de-açúcar. Os autores observaram que sorgo, milho e cana-de-açúcar se localizam num clado separado, porém próximo, do qual as proteínas de arroz se encontram. Já *A. thaliana* e *A. arenosa*, por serem espécies pertencentes a família das dicotiledôneas, estão num clado mais distante. Apesar das proteínas AtDDM1 e SsDDM1 serem evolutivamente distantes, possuem 62,4% de identidade dos 95 aminoácidos (em seus domínios conservados), mostrando que as proteínas são altamente conservadas.

O locus do gene *AtDdm1* (acesso no TAIR pelo número AT5G66750) está localizado entre 26,64 e 26,66 Mb no cromossomo 5 de *Arabidopsis*. Possui o tamanho de 4123pb, apresentando 16 éxons e 15 íntrons. A região codificadora do gene *AtDdm1*, representado pelo cDNA sintetizado a partir do mRNA, contendo apenas a ORF possui 2295pb (número de acesso no GenBank: NM_126073.2). Essa região do cDNA de *AtDdm1* foi amplificada e clonada no plasmídeo pEP10 para a construção do vetor de transformação (PICELLI, 2010).

A proteína DDM1 está envolvida na manutenção de metilações no DNA, a perda desta metilação nos mutantes *ddm1* estaria associada com a desregulação transcricional dos elementos transponíveis (HIROCHIKA; OKAMOTO; KAKUTANI, 2000). Este fato faz com que o genoma se torne menos estável devido ao aumento da atividade dos transposons. Assim, a

proteína DDM1 parece ter função chave no controle de retrotransposição, pois mutantes *ddm1* apresentaram ativação e mobilização de retrotransposons silenciados (TSUKAHARA et al., 2009).

Nas plantas, a metilação do DNA está envolvida na regulação de fenômenos epigenéticos (VANYUSHIN; ASHAPKIN, 2011; YAISH; COLASANTI; ROTHSTEIN, 2011), que incluem o silenciamento transcricional de transposons e transgenes, defesa contra patógenos, regulação de imprinting assim como o silenciamento de genes relacionados ao tempo de floração, controle de identidade do órgão floral, fertilidade e morfologia da folha (MIURA; YONEBAYASHI; YAO et al., 2012).

Visando à interrupção parcial de variações genéticas, algumas espécies como *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa* foram geneticamente transformadas com a utilização do gene *ddm1* em orientação antisenso (HIGO et al., 2012; SASAKI et al., 2012). Em *Arabidopsis*, os autores mostraram que mutantes RNAi para metilação de histona H3, possuíam fortes defeitos de desenvolvimento, quando combinada com a mutação *ddm1* (SASAKI et al., 2012). De acordo com Higo, et al (2012) em arroz, o silenciamento de genes com função homóloga à de DDM1 o genoma apresentou-se maior devido ao não empacotamento da cromatina e com hipometilação do DNA genômico nas sequências de repetidas, padrão semelhante ao encontrado em *Arabidopsis*. Em outro experimento com *Arabidopsis thaliana*, uma nova mutação no mutante *ddm1* ativou o silenciamento de sequências repetidas, inclusive de transposons (LIPPMAN et al., 2004; TSUKAHARA et al., 2009).

2.6 O gene *xth*

A parede celular primária das plantas consiste em microfibrilas de celulose que são conectadas por hemicelulose (principalmente xiloglucanos) e embebidas numa matriz amorfa de pectina e glicoproteínas. A expansão celular é regulada principalmente pela extensibilidade da parede celular e é o resultado do afrouxamento e rearranjo das moléculas de celulose na rede de xiloglucanos (SZYMANSKI; COSGROVE, 2009).

Expansinas são classes de proteínas responsáveis por quebrar as ligações de hidrogênio entre xiloglucanos e celulose, aumentando assim a capacidade de extensão da parede celular (COSGROVE, 2005). Outra classe de proteínas modificadoras de parede celular, xiloglucano endotransglucosilase/hidrolases (*XTHs*), também têm a função de afrouxamento das paredes celulares (HARA et al., 2014). A enzima *XTH* é responsável pela modificação de xiloglucanos de parede celular, o que é importante para a extensibilidade e expansão e divisão celular.

XTHs são uma grande família de enzimas que correspondem a cerca de 33 *open reading frames* em *Arabidopsis thaliana* e 41 em álamo, estas codificam proteínas *XTH* semelhantes (YOKOYAMA; NISHITANI, 2000; GEISLER-LEE et al., 2006; EDUARDO; BEM; VINCENTZ, 2010; EKLÖF; BRUMER, 2010). Tendo em conta toda esta ubiquidade de xiloglucanos e a expressão tecido específica dos genes *xth*, parece que a dinâmica da distribuição de xiloglucanos mediada por *XTHs* participam de uma ampla gama de processos fisiológicos em eudicotiledôneas (HARA et al., 2014).

Em arroz, os membros da família *Xth* são classificados em dois grupos, grupo I/II e III, com base em suas características estruturais (YOKOYAMA; NISHITANI, 2004; YOKOYAMA et al., 2010). O grupo III consiste de dois clados distintos designados Grupo III-A e Grupo III-B. Com base nos dados de cristalografia, membros do Grupo III-A, ao qual pertence Os*XTH19*, apresenta apenas atividade hidrolase em vez da atividade endotransglucosilase (XET) (BAUMANN; EKLO, 2007; EKLÖF; BRUMER, 2010). Entende-se que a maior parte da família Os*XTH* mostram padrões distintos de expressão tecidos específicos como exemplo, Os*XTH19* é especificamente expresso nas zonas em alongamento de vários órgãos, sugerindo que esta proteína tem uma função importante na regulação da expansão das células do arroz (UOZU et al., 2000; JAN et al., 2004; YOKOYAMA; NISHITANI, 2004). A taxa de crescimento dos tecidos também foi correlacionada com abundância de mRNA de *XTH* e atividade de XET em outras gramíneas, como a cevada (*Hordeum vulgare* L.) (SMITH et al., 1996) e milho (*Zea mays* L.) (GENOVESI et al., 2008; HARA et al., 2014).

A maioria das *XTHs* corta e rearranja as moléculas de xiloglucanos pela ação da xiloglucano endotransglucosilase (XEH), enquanto outras hidrolisam os xiloglucanos pela ação de xiloglucanos hidrosilases (XET), (BAUMANN; EKLO, 2007; KAEWTHAI et al., 2012). Ambas as atividades afetam a expansão das células.

Em experimentos com transformação genética de *Arabidopsis thaliana*, pesquisadores concluíram que enzimas *XTHs* estão envolvidas na regulação do espessamento da parede celular em células de hipocótilos e que seu mecanismo de ação é distinto do realizado por expansinas devido às plantas transformadas apresentarem maior crescimento (não afetado pelo pH), em relação às controle (MIEDES et al., 2013).

2.7 PCR em tempo real

PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) permite uma quantificação sensível, específica e reprodutível de ácidos nucleicos (CHANG et al., 2012). Outros métodos comumente utilizados para detectar o nível de expressão de genes incluem northern e southern blots, PCR semi-quantitativo e microarray (HAN et al., 2012). O método proporciona um meio útil e de rápido entendimento da expressão de genes em organismos vivos através da comparação de diferentes amostras.

A análise da expressão gênica é cada vez mais importante em muitos campos da pesquisa biológica, incluindo desenvolvimento de plantas e suas respostas ao estresse abiótico e infecção por patógenos (FAN et al., 2013). Além disso, qRT-PCR é um método de baixo custo em relação aos métodos tradicionais como o southern blot e amplamente aceito no acompanhamento dos níveis de expressão do gene inserido em organismos geneticamente modificados (OGM), bem como no melhoramento genético (LING et al., 2014).

Na primeira fase de replicação do DNA no qRT-PCR é a mais lenta, uma vez que a quantidade de fita molde é relativamente pequena em comparação com as fases posteriores, e os primers necessitam de mais tempo para encontrar regiões complementares (TYBURSKI; STUDZIŃSKA; DACA, 2008). A etapa mais rápida ocorre na próxima fase, chamada de exponencial,

devido a maior quantidade de moléculas de DNA da sequência alvo. O ciclo de fluorescência em que começa a exceder o background é chamado *cycle threshold* (CT) e é o início da fase logarítmica seguinte (KOSERA; RAPACZ, 2013).

A técnica se baseia na utilização de corantes fluorescentes, incluindo SYBR Green, que se liga à fita dupla do DNA sintetizado e detectado através de um aumento de quase 1000 vezes na intensidade de fluorescência (HUGGETT; BUSTIN, 2011). A utilização de oligonucleotídeos fluorescentes em que o sinal é gerado apenas quando a sonda específica hibridiza com a região complementar é ainda mais avançada, esta é seguida de uma hidrólise química das sondas "TaqMan" e podem aumentar significativamente a especificidade da reação (KOSERA; RAPACZ, 2013).

A análise da quantidade de transcritos do gene pode ser com base em cálculos absolutos ou relativos (TYBURSKI; STUDZIŃSKA; DACA, 2008). No método a determinação absoluta da quantidade de transcritos da amostra baseia-se numa curva padrão preparada com diluições em série de uma solução de concentração conhecida da sequência do ensaio. No método relativo, a curva é apenas utilizada para calcular a eficiência da reação, e o resultado é dado em relação a um gene calibrador ou de referência, normalmente o número de transcritos é dado em relação à quantidade de genes de referência pré-definida (KOSERA; RAPACZ, 2013).

Na técnica de PCR em tempo real a introdução de métodos de normalização adequados para validar os resultados é de extrema necessidade. BUSTIN et al. (2009) salientaram que muitos experimentos são erroneamente projetados e de difícil repetição devido à qualidade insuficiente dos dados e a falta de avaliação crítica dos autores na interpretação destes.

Deste modo, a produção de resultados confiáveis neste tipo de estudo traz a necessidade de se ter um gene de referência bem estabelecido para a comparação ser realizada de maneira eficaz, ou seja, a técnica depende do uso de genes endógenos expressos de forma estável (SINTON; FINLAY; LYNCH, 1999; VANGUILDER; VRANA; FREEMAN, 2008; FAN et al., 2013), caso contrário, pode levar a resultados imprecisos (CHANG et al., 2012).

2.8 Genes de referência

Genes de referência podem ser definidos como aqueles que são constitutivamente expressos e necessários para a sobrevivência celular. Estes, geralmente codificam produtos com funções na manutenção da estrutura da parede celular e do metabolismo primário (CHANG et al., 2012). Eles devem ser estáveis quanto ao nível de expressão em várias condições experimentais, tais como estádios de desenvolvimento da planta, tipos de tecidos e estímulos externos (BANDA et al., 2008; HAN et al., 2012).

Alguns exemplos de genes de referência incluem 18S RNA ribossomal (18SRNA), a actina (ACT), tubulina (TUB), gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH), poliubiquitina (UBQ), e factor de alongamento 1 α (EF1 α). Porém, alguns deles, como EF1 α , ACT2, e TUB não satisfazem certos requisitos básicos para o uso como um controle interno em *Arabidopsis thaliana* e tomate, por exemplo (CHANG et al., 2012). Todavia, muitos genes de referência estáveis já há algum tempo foram selecionados em espécies modelo e também em culturas, tais como: *A. thaliana*, arroz (KIM et al., 2003; JAIN et al., 2006), *Brachypodium distachyon* (HONG et al., 2008), trigo (PAOLACCI et al., 2009), cevada (FACCIOLI et al., 2007), soja, tomate (EXPÓSITO-RODRÍGUEZ et al., 2008), batata (NICOT; HOFFMANN; LIPPMANN, 2005), cana-de-açúcar (ISKANDAR et al., 2004) e álamo (BRUNNER; YAKOVLEV; STRAUSS, 2004).

Segundo Ling et al., (2014) e Wan et al. (2010), um gene de referência adequado para análises de qRT-PCR deverá ter as seguintes características: (1) ter uma expressão estável em todas ou na maioria das amostras analisadas; (2) não ter qualquer associação com algum pseudogene, para evitar a amplificação de membros da família de genes não-funcionais; (3) refletir as variações quanto a qualidade e quantidade do RNA, bem como no cDNA e suas amplificações; (4) possuir a estabilidade da transcrição que seja adequada para o gene alvo; e (5) exibir níveis moderados de expressão com Ct variando entre 15 e 30 ciclos

Para a análise do número de cópias inseridas, em que se utiliza DNA como molde, é desejável escolher como referência algum gene que está em

um Ct semelhante com o gene de interesse que por sua vez demonstra a variabilidade que resulta das imperfeições da tecnologia utilizada e nos procedimentos preparatórios, isto assegura que qualquer variação na quantidade de material genético referem-se a mesma medida que a amostra sob investigação (KOSERA; RAPACZ, 2013).

Em cana-de-açúcar existem alguns estudos que buscaram genes de referência para análise do número de cópias inseridas em transgênicos, estes foram realizados com diferentes variedades como os realizados por Casu; Selivanova e Perroux, (2012) com a australiana Q117, estes autores identificaram os genes *aprt* (antranilato fosforybosltransferase) e *p4h* (prolyl 4-hydroxylase) como os melhores para a identificação do gene *neo*. Já Ling et al (2014) com as chinesas ROC-20, ROC-22, FN40, Liucheng03-182 e YC05-179, chegaram a conclusão de que as melhores referencias para identificação do número de cópias são *gapdh* (gliceraldeido 3 fosfato desidrogenase), *ef1α* (elongation fator 1α) e *ef4α* (elongation fator 4α). Xue et al. (2014), testaram as variedades ROC-22 e Badila provenientes também da China, observando que apenas o gene *aprt* tem estabilidade suficiente para a mesma avaliação, porém estes autores utilizaram uma metodologia distinta dos anteriores para a realização dos calculos de número de cópias.

Desta forma observa-se que a identificação do gene de referência mais adequado para o experimento é distinta e depende das condições em que são realizadas o experimento e principalmente da variedade a ser utilizada. Esta normalização é de crucial importância para a validação dos dados e geração de bons resultados de quantificação.

Referencias

ARAUJO, P.G. DE; ROSSI, M.; JESUS, E.M. DE; SACCARO, N.L.; KAJIHARA, D.; MASSA, R.; FELIX, J.M. DE; DRUMMOND, R.D.; FALCO, M.C.; CHABREGAS, S.M.; ULIAN, E.C.; MENOSSI, M.; SLUYS, M.A.V. Transcriptionally active transposable elements in recent hybrid sugarcane. **Plant Journal**, Malden, v. 44, n. 5, p. 707–717, 2005.

BANDA, M.; BOMMINENI, A.; THOMAS, R.A; LUCKINBILL, L.S.; TUCKER, J.D. Evaluation and validation of housekeeping genes in response to ionizing radiation

and chemical exposure for normalizing RNA expression in real-time PCR. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 649, n. 1/2, p. 126–134, 2008. BASNAYAKE, S.W.V.;

MOYLE, R.; BIRCH, R.G. Embryogenic callus proliferation and regeneration conditions for genetic transformation of diverse sugarcane cultivars. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 30, n. 3, p. 439–448, 2011.

BAUMANN, M.J.; EKLO, J.M. structural evidence for the evolution of xyloglucanase activity from xyloglucan endo-transglycosylases: biological implications for cell wall metabolism. **The Plant Cell**, Los Angeles, v. 19, p. 1947–1963, June 2007.

BOWER, R.; BIRCH, R.G. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. **Plant Journal**, Malden, 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**, Lleida, v. 2, n. 3, p. 239–249, 1996.

BRUNNER, A.M.; YAKOVLEV, I.A.; STRAUSS, S.H. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. **BMC Plant Biology**, London, v. 4, p. 14, 2004.

BULA, R.J.; MORROW, R.C.; TIBBITTS, T.W.; BARTA, D.J.; IGNATIUS, R.W.; MARTIN, T.S. Light-emitting diodes as a radiation source for plants. **HortScience**, Los Angeles, v. 26, n. 2, p. 203–205, 1991.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments **Clinical Chemistry**, Boston, v. 55, n. 4 p. 611–622, 2009.

CASU, R.E.; SELIVANOVA, A.; PERROUX, J.M. High-throughput assessment of transgene copy number in sugarcane using real-time quantitative PCR. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 31, n. 1, p. 167–177, 2012.

CHANG, E.; SHI, S.; LIU, J.; CHENG, T.; XUE, L.; YANG, X. Selection of reference genes for quantitative gene expression studies in *Platycladus orientalis* (Cupressaceae) using real-time PCR. **Plos One**, Alabama, v. 7, n. 3, p. 1–10, 2012.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_12_17_09_03_29_boletim_cana_portugues_-_3o_lev_-_15-16.pdf>. Acesso em: 11 fev. 2015.

COSGROVE, D.J. Growth of the plant cell wall. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, London, v. 6, n. 11, p. 850–861, 2005. 31

DUTTA GUPTA, S.; JATOTHU, B. Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in in vitro plant growth and morphogenesis. **Plant Biotechnology Reports**, Daegu, v. 7, n. 3, p. 211–220, 2013.

EDUARDO, L.; BEM, V. DEL; VINCENTZ, M.G.A. Evolution of xyloglucan-related genes in green plants. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 10, n. 1, p. 341, 2010.

EKLÖF, J.M.; BRUMER, H. The XTH gene family: an update on enzyme structure, function, and phylogeny in xyloglucan remodeling. **Plant Physiology**, Palo Alto, v. 153, n. 2, p. 456–466, 2010.

EXPÓSITO-RODRÍGUEZ, M.; BORGES, A.A.; BORGES-PÉREZ, A.; PÉREZ, J. A. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. **BMC Plant Biology**, London, v. 12, p. 1–12, 2008.

FACCIOLI, P.; CICERI, G.P.; PROVERO, P.; STANCA, A.M.; MORCIA, C.; TERZI, V. A combined strategy of “in silico” transcriptome analysis and web search engine optimization allows an agile identification of reference genes suitable for normalization in gene expression studies. **Plant Molecular Biology**, Zurich, v. 63, n. 5, p. 679–688, 2007.

FAN, C.; MA, J.; GUO, Q.; LI, X.; WANG, H.; LU, M. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bamboo (*Phyllostachys edulis*). **Plos One**, Alabama, v. 8, n. 2, p. e56573, 2013.

FOLTA, K.M.; KOSS, L.L.; MCMORROW, R.; KIM, H.-H.; KENITZ, J.D.; WHEELER, R.; SAGER, J.C. Design and fabrication of adjustable red-green-blue LED light arrays for plant research. **BMC Plant Biology**, London, v. 5, p. 17, 2005.

GADALETA, A.; GIANCASPRO, A.; CARDONE, M.F.; BLANCO, A. Real-time PCR for the detection of precise transgene copy number in durum wheat. **Cellular & Molecular Biology Letters**, Wroclaw, v. 16, n. 4, p. 652–668, 2011.

GEISLER-LEE, J.; GEISLER, M.; COUTINHO, P.M.; SEGERMAN, B.; NISHIKUBO, N.; TAKAHASHI, J.; ASPEBORG, H.; DJERBI, S.; MASTER, E.; ANDERSSON-GUNNERA, S.; KARPINSKI, S.; TEERI, T.T.; KLECZKOWSKI, L.A. Poplar carbohydrate-active enzymes: gene identification and expression analyses. **Plant Physiology**, Palo Alto, v. 140, p. 946–962, Mar. 2006.

GENOVESI, V.; FRY, S.C.; RUEL, K.; FERRER, P.; ENCINA, A.; FORNALE, S. ZmXTH1, a new xyloglucan endotransglucosylase / hydrolase in maize, affects cell wall structure and composition in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 4, p. 875–889, 2008.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. 6 ed. England: Exegetics, 1993. v.1, 575p. 32

GUÉNIN, S.; MÉLAINE, M.; PELLOUX, J.; WUKEYTSWINL, O. VAN; 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.

HAN, X.; LU, M.; CHEN, Y.; ZHAN, Z.; CUI, Q.; WANG, Y. Selection of reliable reference genes for gene expression studies using real-time PCR in tung tree during seed development. **Plos One**, Alabama, v. 7, n. 8, p. 1–10, 2012.

HAN, Y.; ZHU, Q.; ZHANG, Z.; MENG, K.; HOU, Y.; BAN, Q. Analysis of xyloglucan endotransglycosylase / hydrolase (XTH) genes and diverse roles of isoenzymes during persimmon fruit development and postharvest softening. **Plos One**, Alabama, v. 10, n. 4, p. 1–20, 2015.

HARA, Y.; YOKOYAMA, R.; OSAKABE, K.; TOKI, S.; NISHITANI, K. Function of xyloglucan endotransglucosylase / hydrolases in rice. **Annals of Botany**, London, v. 114, p. 1309–1318, 2014.

HIGO, H.; TAHIR, M.; TAKASHIMA, K.; MIURA, A.; WATANABE, K.; TAGIRI, A.; UGAKI, M.; ISHIKAWA, R.; EIGUCHI, M.; KURATA, N.; SASAKI, T.; RICHARDS, E.; TAKANO, M.; KISHIMOTO, N.; KAKUTANI, T.; HABU, Y. DDM1 (Decrease in DNA Methylation) genes in rice (*Oryza sativa*). **Molecular Genetics and Genomics**, Kemivägen, v. 287, n. 10, p. 785–792, 2012.

HIROCHIKA, H.; OKAMOTO, H.; KAKUTANI, T. Silencing of retrotransposons in arabidopsis and reactivation by the ddm1 mutation. **The Plant Cell**, Los Angeles, v. 12, n. 3, p. 357–369, 2000.

HONG, S.-Y.; SEO, P.J.; YANG, M.-S.; XIANG, F.; PARK, C.-M. Exploring valid reference genes for gene expression studies in *Brachypodium distachyon* by real-time PCR. **BMC Plant Biology**, London, v. 8, p. 112, 2008.

HUGGETT, J.; BUSTIN, S.A. Standardisation and reporting for nucleic acid quantification. **Accreditation and Quality Assurance**, Geel, v. 16, n. 8, p. 399–405, 2011.

ILIEVA, I.; IVANOVA, T.; NAYDENOV, Y.; DANDOLOV, I.; STEFANOV, D. Plant experiments with light-emitting diode module in Svet space greenhouse. **Advances in Space Research**, Saint-mande, v. 46, n. 7, p. 840–845, 2010.

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 gene expression in sugarcane. **Plant Molecular Biology Reporter**, Dordrecht, v. 22, p. 325–337, Dec. 2004.

IWASAKI, M. Chromatin resetting mechanisms preventing transgenerational inheritance of epigenetic states. **Frontiers in Plant Science**, Melbourne, v. 6, p. 380, May 2015. 33

JAIN, M.; NIJHAWAN, A.; TYAGI, A.K.; KHURANA, J.P. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Martinsried, v. 345, n. 2, p. 646–651, 2006.

JAN, A.; YANG, G.; NAKAMURA, H.; ICHIKAWA, H.; KITANO, H. Characterization of a xyloglucan endotransglucosylase gene that is up-regulated by gibberellin in rice. **Plant Physiology**, Palo Alto, v. 136, p. 3670–3681, Nov. 2004.

JAO, R.C.; LAI, C.C.; FANG, W.; CHANG, S.F. Effects of red light on the growth of *Zantedeschia* plantlets in vitro and tuber formation using light-emitting diodes. **HortScience**, Los Angeles, v. 40, n. 2, p. 436–438, 2005.

JEONG, S.W.; PARK, S.; JIN, J.S.; SEO, O.N.; KIM, G.S.; KIM, Y.H.; BAE, H.; LEE, G.; KIM, S.T.; LEE, W.S.; SHIN, S.C. Influences of four different light-emitting diode lights on flowering and polyphenol variations in the leaves of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, München, v. 60, n. 39, p. 9793–9800, 2012.

JHA, B.; MISHRA, A.; JHA, A.; JOSHI, M. Developing transgenic jatropha using the *sbhx1* gene from an extreme halophyte for cultivation in saline wasteland. **Plos One**, Alabama, v. 8, n. 8, p.136-144, 2013.

JIMÉNEZ, V.M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, Penrith, v. 47, p. 91–110, 2005.

JOHANNES, F.; PORCHER, E.; TEIXEIRA, F.K.; SALIBA-COLOMBANI, V.; SIMON, M.; AGIER, N.; BULSKI, A.; ALBUISSON, J.; HEREDIA, F.; AUDIGIER, P.; BOUCHEZ, D.; DILLMANN, C.; GUERCHE, P.; HOSPITAL, F.; COLOT, V. Assessing the impact of transgenerational epigenetic variation on complex traits. **PLoS Genetics**, Stanford, v. 5, n. 6, p. 91-110, 2009.

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**, Berlin, v. 29, n. 2, p. 173–183, 2010.

KAEWTHAI, N.; GENDRE, D.; EKLOF, J.M.; IBATULLIN, F.M.; EZCURRA, I.; BHALERAO, R.; BRUMER, H. Group III-A XTH genes of *Arabidopsis thaliana* encode predominant xyloglucan endo-hydrolases that are dispensable for normal growth. **Plant Physiology**, Palo Alto, v. 161, p. 440–454, Jan. 2012. KIM, B.R.;

NAM, H.Y.; KIM, S.U.; KIM, S.I.; CHANG, Y.J. Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice. **Biotechnology Letters**, Birmingham, v. 25, n. 21, p. 1869–1872, 2003.

KOSERA, B.; RAPACZ, M. Reference genes in real-time PCR. **Journal of Applied Genetics**, Poznan, v.54, p. 391–406, 2013. 34

LAKSHMANAN, P. Invited review addendum: somatic embryogenesis in sugarcane; an addendum to the invited review „sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. **In Vitro Cellulae and Developmental Biology—Plant**, Columbia, v. 41, p. 201–205, June 2006.

LAW, J.A.; JACOBSEN, S.E. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 11, n. 3, p. 204–220, 2011.

LING, H.; WU, Q.; GUO, J.; XU, L.; QUE, Y. Comprehensive selection of reference genes for gene expression normalization in sugarcane by real time quantitative RT-PCR. **Plos One**, Alabama, v. 9, n. 5, p. 469-479, 2014.

LIPPMAN, Z.; GENDREL, A.-V.; BLACK, M.; VAUGHN, M. W.; DEDHIA, N.; MCCOMBIE, W.R.; LAVINE, K.; MITTAL, V.; MAY, B.; KASSCHAU, K.D.; CARRINGTON, J.C.; DOERGE, R.W.; COLOT, V.; MARTIENSSSEN, R. Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. **Nature**, London, v. 430, n. 6998, p. 471–476, 2004.

MANICKAVASAGAM, M.; GANAPATHI, A.; ANBAZHAGAN, V. R.; SUHAKAR, B.; SELVARAJ, N.; VASUDEVAN, A.; KASTHURIRENGAN, S. Genetic transformation and hybridization agrobacterium-mediated genetic transformation and development of herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum* species hybrids) using axillary buds. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 23, p. 134–143, 2004.

MANNERS, J.M.; CASU, R.E. Transcriptome analysis and functional genomics of sugarcane. **Tropical Plant Biology**, Champaign, v.4, p. 9–21, 2011.

MASSA, G.D.; DRIVE, A.M.; LAFAYETTE, W.; KIM, H.; WHEELER, R.M.; MITCHELL, C.A. Plant productivity in response to LED lighting. **Tropical Plant Biology**, Champaign, v. 43, n. 7, p. 1951–1956, 2010.

MIEDES, E.; SUSLOV, D.; VANDENBUSSCHE, F.; KENOBI, K.; IVAKOV, A.; STRAETEN, D. VAN DER; LORENCES, E. P.; MELLEROWICZ, E.J.; VERBELEN, J.P.; VISSENBERG, K. Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) overexpression affects growth and cell wall mechanics in etiolated *Arabidopsis* hypocotyls. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 8, p. 2481–2497, 2013.

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

MORINI, S.; MULEO, R. Effects of light quality on micropropagation of woody species. In: JAIN, S.M.; ISHII, K. **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, p.3-35, 2003.

MORROW, R.C. LED lighting in horticulture. **HortScience**, Los Angeles, v. 43, n. 7, p. 1947–1950, 2008.

NICOT, N.; HOFFMANN, L.; LIPPMANN, C.D.R.P. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 421, p. 2907–2914, 2005. 35

PAOLACCI, A.R.; TANZARELLA, O.A.; PORCEDDU, E.; CIAFFI, M. Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. **BMC Molecular Biology**, London, v. 10, p. 11-27, 2009.

PICELLI, E.C.M. **Cultura de tecidos e transformação genética com o gene Ddm1 no estudo do silenciamento de elementos de transposição**. 2010. 140 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

PINTO, G.; SILVA, S.; LOUREIRO, J.; COSTA, A.; CELESTE, M.; CONCEIC, N.; ARAU, C. Acclimatization of secondary somatic embryos derived plants of *Eucalyptus globulus* Labill.: an ultrastructural approach. **Trees**, Vancouver, v. 25, p. 383–392, 2011.

RANGWALA, S.H.; RICHARDS, E.J. Differential epigenetic regulation within an Arabidopsis retroposon family. **Genetics**, Berkeley, v. 176, n. 1, p. 151–160, 2007.

RANI, K.; SANDHU, S.K.; GOSAL, S.S. Genetic augmentation of sugarcane through direct gene transformation with osgly II gene construct. **Sugar Tech**, Uttar Pradesh, v. 14, n. 3, p. 229–236, 2012.

REBOLLO, R.; ROMANISH, M.T.; MAGER, D.L. Transposable elements: an abundant and natural source of regulatory sequences for host genes. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 46, n. 1, p. 21-42, 2011.

REINDERS, J.; WULFF, B.B.H.; MIROUZE, M.; MARÍ-ORDOÑEZ, A.; DAPP, M.; ROZHON, W.; BUCHER, E.; THEILER, G.; PASZKOWSKI, J. Compromised stability of DNA methylation and transposon immobilization in mosaic Arabidopsis epigenomes. **Genes and Development**, Melbourne, v. 23, n. 8, p. 939–950, 2009.

SASAKI, T.; KOBAYASHI, A.; SAZE, H.; KAKUTANI, T. RNAi-independent de novo DNA methylation revealed in Arabidopsis mutants of chromatin remodeling gene DDM1. **Plant Journal**, Malden, v. 70, n. 5, p. 750–758, 2012.

SILVA, M.M.A.; OLIVEIRA, A.L.B. DE; OLIVEIRA-FILHO, R.A.; GOUVEIA-NETO, A.S.; CAMARA, T.J.R.; WILLADINO, L.G. Effect of blue/red LED light combination on growth and morphogenesis of *Saccharum officinarum* plantlets in vitro. **Progress in Biomedical Optics and Imaging**, Bellingham, v. 8947, p. 89471X, 2014.

SINGH, R.K.; KUMAR, P.; TIWARI, N.N.; RASTOGI, J.; SINGH, S.P. Current status of sugarcane transgenic: an overview. **Advancements in Genetic Engineering**, Morgantown, v. 2, n. 2, p. 1–7, 2013.

SMITH, R.C.; MATTHEWS, P.R.; SCHUNMANN, P.H.D.; CHANDLER, P.M. The regulation of leaf elongation and xyloglucan endotransglycosylase by gibberellin in "Himalaya" barley (*Hordeum vulgare* L.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 47, n. 302, p. 1395–1404, 1996. 36

SUPRASANNA, P.; PATADE, V.Y.; DESAI, N.S.; DEVARUMATH, R.M.; KAWAR, P.G.; PAGARIYA, M.C.; GANAPATHI, A.; MANICKAVASAGAM, M.; BABU, K.H.

Biotechnological developments in sugarcane improvement: an overview. **Sugar Tech**, Uttar Pradesh, v. 13, p. 322–335, Dec. 2011.

SZYMANSKI, D.B.; COSGROVE, D.J. Dynamic coordination of cytoskeletal and cell wall systems during plant cell morphogenesis review. **Current Biology**, Riverport Lane, v. 19, n. 17, p. R800–R811, 2009.

TAPARIA, Y.; FOUAD, W.M.; GALLO, M. Rapid production of transgenic sugarcane with the introduction of simple loci following biolistic transfer of a minimal expression cassette and direct embryogenesis. **In vitro cellular developmental biology**, Columbia, v. 48, p.15–22, 2012.

TSUKAHARA, S.; KOBAYASHI, A.; KAWABE, A.; MATHIEU, O.; MIURA, A.; KAKUTANI, T. Bursts of retrotransposition reproduced in Arabidopsis. **Nature**, London, v. 461, n. 7262, p. 423–426, 2009.

TYBURSKI, J.; STUDZIŃSKA, A.; DACA, P. PCR in real time: the methods of data analysis. **Biotechnologia**, Poznan, v. 80, p.86–96, 2008.

UOZU, S.; TANAKA-UEGUCHI, M.; KITANO, H.; HATTORI, K.; MATSUOKA, M. Characterization of XET-related genes of rice. **Plant Physiology**, Palo Alto, v. 122, p. 853–859, Mar. 2000.

VANGUILDER, H.D.; VRANA, K.E.; FREEMAN, W.M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. **BioTechniques**, New York, v. 44, n. 5, p. 619–626, 2008.

VANYUSHIN, B.F.; ASHAPKIN, V. V. Biochimica et biophysica acta DNA methylation in higher plants: past, present and future ☆. **BBA - Gene Regulatory Mechanisms**, Amsterdam, v. 1809, n. 8, p. 360–368, 2011.

VICIENT, C.M. Transcriptional activity of transposable elements in maize. **BMC Genomics**, Carbondale, v. 11, n. 1, p. 601, 2010.

WAN, H.; ZHAO, Z.; QIAN, C.; SUI, Y.; MALIK, A.A.; CHEN, J. Selection of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time polymerase chain reaction in cucumber. **Analytical Biochemistry**, Bethesda, v. 399, n. 2, p. 257–261, 2010.

XUE, B.; GUO, J.; QUE, Y.; FU, Z.; WU, L.; XU, L. Selection of suitable endogenous reference genes for relative copy number detection in sugarcane **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 15, p. 8846–8862, 2014.

YAISH, M.W.; COLASANTI, J.; ROTHSTEIN, S.J. The role of epigenetic processes in controlling flowering time in plants exposed to stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 11, p. 3727–3735, 2011. 37

YANAGI, T.; YACHI, T.; OKUDA, N.; OKAMOTO, K. Light quality of continuous illuminating at night to induce floral initiation of *Fragaria chiloensis* L. CHI-24-1. **Scientia Horticulturae**, British Columbia, v. 109, n. 4, p. 309–314, 2006.

YAO, Y.; BILICHAK, A.; GOLUBOV, A.; KOVALCHUK, I. Ddm1 plants are sensitive to methyl methane sulfonate and NaCl stresses and are deficient in DNA repair. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 31, n. 9, p. 1549–1561, 2012.

YOKOYAMA, R.; NISHITANI, K. Functional diversity of xyloglucan-related proteins and its implications in the cell wall dynamics in plants. **Plant & Cell Physiology**, Oxford, v. 2, p. 598–604, 2000.

YOKOYAMA, R.; UWAGAKI, Y.; SASAKI, H.; HARADA, T.; HIWATASHI, Y.; HASEBE, M. Biological implications of the occurrence of 32 members of the XTH (xyloglucan endotransglucosylase / hydrolase) family of proteins in the bryophyte *Physcomitrella patens*. **Plant Journal**, Freiburg, v.2, p. 645–656, 2010.

YORIO, N.C.; GOINS, G.D.; KAGIE, H.R.; CORPORATION, D.; DYN-, M.C.; WHEELER, R.M.; SAGER, J.C. Improving spinach, radish, and lettuce growth under red light-emitting diodes (LEDs) with blue light supplementation. **HortScience**, Los Angeles, v. 36, n. 2, p. 380–383, 2001.

ZHANG, T.; MARUHNICH, S.A.; FOLTA, K.M. Green light induces shade avoidance symptoms. **Plant Physiology**, Palo Alto, v. 157, n. 3, p. 1528–1536, 2011.

ZHU, J.; ZHANG, L.; LI, W.; HAN, S.; YANG, W.; QI, L. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in *Caragana intermedia* under different abiotic stress conditions. **Plos One**, Alabama, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2013.

3. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE CANA-DE-AÇÚCAR COM OS GENES *AtDdm1* E *xth*

Resumo

Com a crescente demanda por produtos agrícolas com maior produtividade, a transformação genética de plantas se mostra uma alternativa viável para a geração de variedades de cana-de-açúcar mais rentáveis. Estratégias que visem o aperfeiçoamento da técnica são vantajosas e precisam ser adequadas à cada variedade a ser melhorada. Neste intuito, para a variedade SP803280 foram realizados, experimentos visando a melhoria das condições de cultivo e seleção *in vitro* dos materiais vegetais comumente utilizados como discos foliares formados por folhas imaturas, calos embriogênicos e plântulas. Este estudo teve como objetivos, a avaliação da melhora da regeneração e desenvolvimento das plantas a partir de calos e discos foliares pela exposição a diferentes qualidades de luz (fluorescente branca, LED e a junção destas), o estabelecimento da concentração do antibiótico geneticina a ser utilizada para a seleção dos eventos transgênicos, além da transformação genética e averiguação dos genes inseridos. No processo de transformação genética, foram utilizados calos embriogênicos com aproximadamente 60 dias após a data de inoculação como material vegetal. Para isto, partículas de ouro de 1 μm foram recobertas com os plasmídeos pEP010 e pHAC17L1_ *xth* que contém os genes *AtDdm1* e *xth* individualmente e em conjunto em cotransformação com o plasmídeo pHA9 que contém o gene *neo* que confere resistência à geneticina. Os resultados mostram que para a regeneração de calos a luz branca e a junção das luzes LED e branca se proporcionaram maior porcentagem de regeneração e desenvolvimento das plantas. Já para discos, o melhor desenvolvimento foi observado nas luzes LED e branca separadamente. No teste de mortalidade de plantas, tanto para calos como para plântulas, uma concentração entre 40 e 50 mgL^{-1} é a mais recomendada. A transformação genética gerou taxas de sucesso para o gene *xth* variando entre 2,5 à 18,3% dependendo da data do bombardeamento. Já para o gene *AtDdm1* apenas 2,2% de sucesso foi alcançado em um bombardeamento.

Palavras chave: LED; Calos embriogênicos; Plasmídeos; Seleção de transgênicos

Abstract

With the growing demand for agricultural products with higher productivity, the genetic transformation of plants appears as a viable alternative for the generation of more profitable sugarcane varieties. Strategies that aims the improvement of this technique are advantageous and must be adequate for each variety to be improved. With this purpose, regarding the SP803280

variety, experiments aiming to improve the cultivation conditions and in vitro selection of plant materials commonly used as leaf discs formed by immature leaves, embryogenic callus and seedlings were carried out. This study aims were to evaluate the improvement of plants regeneration and development from callus and leaf discs through exposure to different light qualities (white fluorescent, LED and the combination of these), the establishment of geneticin antibiotic concentration to be used for transgenic events selection, and the genetic transformation and as containment of the inserted genes. In the genetic transformation process, embryogenic calli with approximately 60 days after inoculation date were used as plant material. During the process, 1uM gold particles were covered with pEP010 and pHAC17L1_xth plasmids that contains *AtDdm1* and *xth* genes individually and along with in cotransformation with pHA9 plasmid which contains *neo* gene that provides geneticin resistance. The results show that, for callus regeneration, the white light and the combination of LED and white lights provided a higher percentage of plants regeneration and development. Regarding the discs, the best plant development was noticed with the use of LED and white light separately. In the plants mortality test, for both callus and seedlings a concentration between 40 and 50 mg L⁻¹ is the most recommended. Genetic transformation generated success rates for *xth* gene that ranged from 2.5 to 18.3%, depending on the bombardment date. As for *AtDdm1* gene, only a success rate of 2.2% was reached in one bombardment.

Keywords: LED; Embriogenic callus; Plasmid; Transgenic selection

3.1 Introdução

Com o aumento populacional crescente, existe a preocupação com relação ao abastecimento de alimentos e energia, até mesmo porque a falta destes recursos já ocorrem em diversas localidades. Este fato torna urgente a busca por estratégias biotecnológicas que aumentem a produtividade das culturas. Deste modo, a transformação genética de plantas é uma alternativa na busca da melhora na qualidade e produtividade de mudas e sementes. A melhoria genética das espécies não é um fato atual, há séculos o homem vem cruzando espécies na busca por características de maior interesse produtivo.

A biotecnologia vegetal tem feito progressos significativos nas últimas décadas, estes englobam desenvolvimentos na engenharia genética de plantas. Cultivos geneticamente modificados aparecem como recentes avanços tecnológicos para ajudar no incremento da produção alimentar, principalmente por trazerem a expectativa de solucionar limitações de produção com custos

mínimos e menor poluição ambiental (SINGH et al., 2013). Cultivos transgênicos podem oferecer vantagens significativas de produção, como a diminuição no uso indiscriminado de herbicidas e de pesticidas.

A cana-de-açúcar (híbridos interespecíficos de *Sacharum*) é uma das principais culturas do mundo, a partir das quais os principais produtos comerciais (açúcar, etanol e biomassa celulósica) são colhidas a partir dos tecidos do colmo (MOYLE; BIRCH, 2013). A cultura é responsável por grande porcentagem da produção de etanol e açúcar mundial, no Brasil, especialmente é a principal fonte (CONAB, 2015).

As variedades utilizadas atualmente são resultado de cruzamentos interespecíficos que vem sendo realizados há centenas de anos na prospecção de mudas cada vez mais produtivas e com características de interesse para cada território onde foram introduzidas. Por causa destes, o genoma das variedades apresenta um grande tamanho, polianeuploidia, que aliadas à baixa fertilidade e as complexas interações ambientais dificultam a reprodução desta cultura (SINGH et al., 2013). Esta complexidade genômica, torna a engenharia genética de cana-de-açúcar um desafio aos pesquisadores.

O cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar já é bem estabelecido para a maioria das variedades, porém estratégias que visem aumentar a velocidade de obtenção e crescimento das plantas são válidas. Nos últimos 20 anos a tecnologia de luzes LED, proporcionou à vários cultivos um incremento no desenvolvimento *in vitro* porém testes em cana-de-açúcar ainda são escassos. Apenas um experimento utilizando este tipo de tecnologia foi relatado na literatura com resultados promissores ao utilizar luzes de comprimentos de onda diferentes (SILVA et al., 2014).

A transformação genética, apesar de desafiadora é uma estratégia bastante promissora no que diz respeito a produção de variedades que apresentam características selecionadas de interesse comercial em menos tempo e com maior confiabilidade. Esta técnica foi utilizada por vários pesquisadores introduzindo genes com diversas propostas como genes de aumento de resistência a herbicidas (FALCO; TULMANN NETO; ULIAN, 2000), de interferência na morte celular programada (MELOTTO-PASSARIN, 2009), aumento de estabilidade do genoma (PICELLI, 2010), diminuição do conteúdo

de lignina (BARBOSA, 2010). Recentemente na busca por metodologias mais eficazes os autores tem utilizado a estratégia de transformação por cassetes mínimos que contém apenas a parte do gene de interesse e seu promotor e terminador, evitando a inserção de segmentos indesejados de plasmídeos de construção no DNA da planta de interesse (KIM; GALLO; ALTPETER, 2012; XIONG et al., 2013; FOUAD et al., 2015).

Deste modo, o objetivo desse trabalho é melhorar as condições de cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar avaliando a melhor fonte de luz e condições de seleção proporcionando um protocolo para a transformação genética com o gene *AtDdm1* e *xth*.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Local dos experimentos e Material Vegetal

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC), localizado na Escola Superior de Agricultura da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP).

Para os experimentos de transformação genética foram utilizados calos provenientes da inoculação de folhas imaturas de cana-de-açúcar da variedade SP803280.

3.2.2 Inoculação de material e obtenção de calos

Plantas de cana-de-açúcar da variedade SP803280, com idade variando entre 6 e 8 meses foram coletadas em seguida realizou-se a retirada dos toletes que consistem da região apical de aproximadamente 40 cm. Estes contém o meristema apical caulinar é protegido por folhas jovens enroladas, esta estrutura é denominada palmito.

Após um período de 12 horas da coleta, em que o material ficou estacado em câmara fria à 4 °C para a redução do metabolismo, realizou-se a assepsia do material por meio da tríplice lavagem dos palmitos em etanol 70% v/v. Posteriormente, em condições assépticas, foram retiradas 1 ou 2 folhas dentro de um ambiente asséptico e os palmitos foram transversalmente

seccionados em segmentos de aproximadamente 2 mm de espessura. Estes explantes foram cultivados em meio de cultura MS3C que consiste do meio basal MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 5% de água de coco (v/v), 3 mgL⁻¹ de ácido 2,4-diclofenoxiacético (2,4-D), 150 mgL⁻¹ de ácido cítrico, 30 gL⁻¹ de sacarose e solidificado com 2,3 gL⁻¹ de Phytigel® (Sigma). O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem à 121°C por 20 minutos. O material foi incubado em sala de crescimento na ausência de luz com temperatura de 26+/- 2°C.

O subcultivo do material inoculado foi realizado a cada 15 dias, momento em que o material com maior característica embriogênica foi selecionado e transferido para novo meio MS3C. No total foram realizados 4 subcultivos totalizando de 60 à 75 dias para a obtenção dos melhores calos.

3.2.3 Exposição às diferentes qualidades de luz

Para a exposição às diferentes qualidades de luz, 15 frascos contendo 4 discos foliares (com 7 dias de inoculação) e 15 frascos contendo 10 calos (com 70 dias da inoculação), foram inoculados em meio MRP que consiste dos sais do meio basal MS acrescido de 0,1 mgL⁻¹ de ácido naftaleno acético (ANA) e 0,45 mgL⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP). Os materiais foram mantidos em fotoperíodo de 16 horas nos tratamentos na temperatura de 26 °C +/- 2 °C de exposição à luz. Estes consistiram da exposição à luz fluorescente branca (OSRAM , FO 32W/640) que possui comprimentos de onda variando entre 380 e 780nm e irradiância de 800 µmol.m⁻².s⁻¹, LED (LabPAR:LL-HR/DB-01, LabLumens) que emite em comprimento de onda entre 400 e 700 nm e irradiância de 560 µmol.m⁻².s⁻¹ e na combinação das duas que gera 1100 µmol.m⁻².s⁻¹ de irradiância. Foram realizadas duas transferências de meio de cultura para meio MS foram realizadas aos 30 e 60 dias de cultivo.

Após 30 e 90 dias da data de inoculação foi realizada a avaliação visual em que foram analisados o nível de oxidação do material, a área do material coberta por brotações de plantas e na última avaliação a altura média das plantas regeneradas. Foram atribuídas notas de acordo com a tabela 1.

O delineamento do experimento foi inteiramente casualizado composto de 3 tratamentos, 15 repetições, 10 parcelas para calos e 4 parcelas para discos. As médias das notas foram submetidas à análise de variância seguida pelo teste de Tukey à 5% de significância. O software SISVAR foi utilizado para a realização das análises estatísticas.

Tabela 1: Notas atribuídas ao material vegetal em análise após 60 dias do início do experimento de exposição à diferentes qualidades de luz

OXIDAÇÃO	1 - não oxidado
	2 - 25% do material oxidado
	3 - 50% do material oxidado
	4 - 75% do material oxidado
	5 - 100% do material oxidado
ÁREA COBERTA POR PLANTAS	1 - 0%
	2 - 25%
	3 - 50%
	4 - 75%
	5 - 100%
ALTURA MÉDIA DAS PLANTAS	1 - Planta não regenerada
	2 - Menores que 3 cm
	3 - Entre 3 e 10 cm
	4 - Maiores que 10 cm

3.2.4 Teste de resistência à concentrações de geneticina

Com o intuito de identificar a concentração do antibiótico geneticina para a seleção das plantas possivelmente transgênicas calos embriogênicos e plântulas da variedade SP803280 selvagem foram expostos à diferentes concentrações do agente seletivo.

Em um delineamento inteiramente casualizado, 50 calos (com 60 dias da data de inoculação - R4) foram inoculados em meio de cultura MRP (MS +0,1 mgL⁻¹ ANA + 0,45 mgL⁻¹ BAP) e 50 plântulas (5 por frasco) foram inoculadas em meio de cultura MS suplementado com as dosagens, 0 (controle) 30, 40, 50 e 60 mgL⁻¹ de geneticina com e sem conversão. Esta conversão foi realizada através de regra de três simples levando em

consideração a potencia do antibiótico ($\mu\text{g}/\text{mg}$) fornecida pelo fabricante e pode ser correlacionada à quantidade do princípio ativo geneticina em cada miligrama do produto. A geneticina utilizada no experimento foi produzida pela empresa Phytotechnology e possuía potencia de 856U.

O material foi mantido em sala de crescimento com fotoperíodo de 16h e temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Nos períodos de 30 e 60 dias após a inoculação foram realizadas as avaliações de sobrevivência das plântulas.

3.2.5 Transformação genética com os genes *Ddm1* e *xth*

Partículas de ouro com diâmetro de $1 \mu\text{m}$ foram recobertas com DNA dos plasmídeos pHA9 (sintetizado pelo Dr. H. Albert, do Hawaiian Agricultural Research Center, Honolulu, Hawaii, USA) e do gene de interesse (figuras 1, e 3). Para isto, estas foram preparadas em quantidade suficiente para cada 10 disparos. Foram pesadas 2,2 mg de ouro, estas foram lavadas pela suspensão em $100 \mu\text{L}$ de etanol 100% e centrifugadas a 5500 rpm por 1 segundo. O sobrenadante foi retirado e procedeu-se a ressuspensão das partículas em 1 mL de água MilliQ estéril seguido de centrifugação a 6500 rpm por 1 segundo. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em $250 \mu\text{L}$ de água estéril, foram adicionados os seguintes itens seguido de vortexação na seguinte ordem: 25 μg de DNA (plasmídeo de interesse + plasmídeo de seleção), $250 \mu\text{L}$ de CaCl_2 (2,5 M) e $50 \mu\text{L}$ de espermidina (0,1 M). Incubou-se a suspensão no gelo por 10 minutos sendo que a cada 1 minuto procedeu-se nova vortexação do tubo. Seguiu-se uma centrifugação por 1 segundo à 5500 rpm e remoção do sobrenadante, adicionou-se $600 \mu\text{L}$ de etanol 100% para a ressuspensão e nova centrifugação. Após este procedimento foi repetido, as partículas foram ressuspensionadas em $65 \mu\text{L}$ de etanol para que $6,5 \mu\text{L}$ da suspensão fosse utilizado em cada disparo.

Foram preparadas placas com 80 calos embriogênicos sobre um papel filtro em meio osmótico que consiste dos sais e vitaminas do meio MS acrescidos de $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ de cinetina, 30 gL^{-1} de sacarose, 73 gL^{-1} de manitol e

73 gL⁻¹ de sorbitol e 150 mgL⁻¹ de ácido cítrico. O material foi mantido no escuro por 4 horas antes do bombardeamento.

As partículas foram precipitadas em membrana de carregamento e procedeu-se o bombardeamento com a pressão de hélio de 1100 psi com a utilização do equipamento PDS-1000/He Biolistic® Particle Delivery System (BioRad). As placas foram alocadas a 9 cm do aparato de disparo.

Após 4 horas do bombardeamento os calos foram transferidos para meio MS3C e incubados a 25 +/- 2 °C no escuro para recuperação do choque causado no bombardeamento. Passados 4 dias os calos foram transferidos para frascos com meio MRP suplementado com o agente seletivo geneticina (30mgL⁻¹) e acondicionados em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 27°C ± 1. Depois de 1 mês da passagem dos calos para o fotoperíodo as regiões que se apresentavam aptas à regeneração das plantas foram transferidas para meio MS com 30mgL⁻¹ de geneticina para a seleção, alongamento e perfilhamento das plantas.

Na transformação genética com o gene *Ddm1* foi utilizado o plasmídeo pEP010 (PICELLI, 2010) que contém o cassete do promotor Ubi seguido do gene *AtDdm1* e terminador T-Nos (Figura 1) em cotransformação com o plasmídeo pHA9 que contém o cassete do promotor Ubi seguido do gene *neo* e terminador T-Nos (Figura 2).

O cDNA do gene *AtDdm1* foi amplificada e clonada no plasmídeo pEP10 para a construção do vetor de transformação e possui o tamanho de 4123pb, apresentando 16 éxons e 15 íntrons. A região codificadora do gene *AtDdm1*, representado pelo cDNA sintetizado a partir do mRNA, contendo apenas a ORF que possui 2295pb (número de acesso no GenBank: NM_126073.2.).

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

Figura 2: Esquema representativo do plasmídeo pHA9 que contém o cassete de expressão do gene *neo* (neomicina fosfotransferase), sob o controle do promotor da ubiquitina do milho (Ubi-1) e o terminador da nopalina sintase (T-nos). As setas indicam a posição dos primers *neo* (Forward) e *neo* (Reverse). Sítios de restrição: B, BamHI; Bg, BglII; E, EcoRI; H, HindIII; P, PstI; Sa, Sall; Sp, SphI; T, TthI; X, XbaI

Na transformação genética com o gene *xth* foi utilizado o plasmídeo pHAC17L1_XTH (sintetizado pelo Dr. Sávio Siqueira Ferreira do Laboratório de Transdução de Sinal - Sinalização e redes regulatórias em cana-de-açúcar Instituto de Química-USP) que contém o cassete do promotor Ubi seguido do gene *xth* e terminador T-Nos (Figura 3) em cotransformação com o plasmídeo pHA9 que contém o cassete do promotor Ubi seguido do gene *neo* e terminador T-Nos (Figura 2).

Figura 3: Esquema representativo do plasmídeo pHAC17L1_XTH com 5150 pb que contém o cassete de expressão da ORF do gene *xth*. Contém o promotor da ubiquitina do milho (Ubi-1), o cDNA AtDdm1 e o terminador da nopalina nopalina sintase (T-nos). As setas indicam a posição de pareamento dos primers Ubi-1 (Forward) e *xth* (Reverse). Os principais sítios de restrição para confirmação do plasmídeo estão posicionados no próprio esquema. *Enzimas de restrição que clivam em mais de uma posição

Em todos os bombardeamentos realizados foram realizados 2 modalidades de preparação de partículas. A primeira contava da preparação somente de um gene de interesse com o gene de seleção e a segunda consistia na junção dos dois genes de interesse com o de seleção. A cada bombardeamento foram preparadas 5 placas para cada tratamento e disparos duplos em cada placa foram realizados.

3.2.6 Extração de DNA

Após o período de aproximadamente 3 meses da data do bombardeamento, folhas das plantas regeneradas em meio seletivo com 30 mgL⁻¹ de geneticina foram coletadas para a extração do DNA genômico.

Para isto, foi utilizado o protocolo de extração CTAB (Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide) Doyle e Doyle (1990) com modificações. Aproximadamente 200 mg de tecido vegetal foi macerado em nitrogênio líquido e transferido para tubo Eppendorf de 1,5 mL contendo 600 µL de tampão de extração (2% p.v⁻¹ de CTAB; 2,5% p.v⁻¹ de PVP-40; 2M NaCl; 100 mM tris-HCl pH 8,0; 25 mM EDTA pH 8,0) pré-aquecido a 65 °C. A solução foi incubada por 30 minutos a 65 °C, posteriormente foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio: álcool isoamílico 24:1 (v.v⁻¹), seguido de

homogeneização e centrifugação (13.000 rpm) por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo onde foi adicionado o mesmo volume coletado de clorofórmio: álcool isoamílico 24:1 (v.v⁻¹) seguido de outra agitação e centrifugação nas mesmas condições. Posteriormente ao sobrenadante coletado e transferido para novo tubo, foi adicionado 2 µL de Rnase A na concentração estoque de 100 µg.mL⁻¹ e incubado a 37 °C por 30 minutos. Para a precipitação foi adicionado 1 volume de álcool isopropílico seguido de centrifugação à 13.000 rpm por 30 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado, o pelet foi lavado em 500 µL de etanol 70% v/v seguido de nova centrifugação (13.000 rpm) por 10 minutos e ressuspendido em 30 µL de água Milli-Q autoclavada. As amostras foram armazenadas a -20° C. A integridade e quantidade do DNA foi verificada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

3.2.7 Averiguação de plantas transgênicas

Para a confirmação da inserção dos genes foi utilizada a técnica de PCR com aproximadamente 25 ng de DNA genômico.

A reação de PCR para confirmação da presença do gene *Ddm1* foi realizada conforme o procedimento a seguir: desnaturação inicial a 94°C por 5 min; 40 ciclos: 1 minuto a 94°C para desnaturação, 50 segundos a 58,5°C para anelamento dos *primers* e 50 segundos a 72°C para extensão; extensão final a 72°C por 10 minutos. Os *primers* utilizados na detecção do transgene foram: *Forward* (senso) – 5` CCT GCC TTC ATA CGC TAT TTA TTT GCT TG 3` e *Reverse* (antissenso) – 5` GAT CTT GAA ATC ATA GCA GCA ACC GC 3`. O primer *Forward* (senso) na região terminal do promotor *Ubi-1* (íntron) e do primer *Reverse* (antissenso) na sequência do gene *AtDdm1*. Foram utilizados controles (positivos e negativos) para a validação dos resultados. Como controle negativo das reações foi utilizado o branco (mix da reação apenas) e plantas de cana-de-açúcar não transformadas (WT). Como controle positivo, o plasmídeo pEP010, o qual apresenta a presença do gene *AtDdm1* foi utilizado.

A reação de PCR para a identificação da inserção do gene *xth* foi realizada conforme o protocolo a seguir: desnaturação inicial a 94°C por 4 min;

40 ciclos: 50 segundos a 94°C para desnaturação, 50 segundos a 60°C para anelamento dos *primers* e 1 minuto a 72 °C para extensão; extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os *primers* utilizados na detecção do transgene foram: *Forward* (senso) – 5`ACATGCAGATCAAGCTGGTG3` e *Reverse* (antissenso) – 5`AGGTGTGGAAGTCCTTGGTG3`. Foram utilizados controles (positivos e negativos) para a validação dos resultados. Como controle negativo das reações foi utilizado o branco (mix da reação apenas) e plantas de cana-de-açúcar não transformadas ou controle (WT). Para o controle positivo, o plasmídeo pHAC17/L1_XTH correspondente ao gene a ser detectado, foi utilizado.

A reação de PCR para a identificação da inserção do gene *neo* foi realizada conforme o protocolo a seguir: desnaturação inicial a 94°C por 5 min; 40 ciclos: 50 segundos a 94°C para desnaturação, 50 segundos a 60°C para anelamento dos *primers* e 50 segundos a 72 °C para extensão; extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os *primers* utilizados na detecção do transgene foram: *Forward* (senso) 5`CCTGCCTTCATACGCTATTTATTGCTTG3` e *Reverse* (antissenso) 5'TCGACAAGACCGGCTTCCATC3'. Foram utilizados controles (positivos e negativos) para a validação dos resultados. Como controle negativo das reações foi utilizado o branco (mix da reação apenas) e plantas de cana-de-açúcar não transformadas ou controle (WT). Para o controle positivo, o plasmídeo pH9 o gene *neo* a ser detectado, foi utilizado.

Os resultados das PCRs foram analisados em gel de agarose 1%. e fotografados em fotodocumentador Gel Doc™ XR+ System (Bio-Rad).

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Exposição às diferentes qualidades de luz

Na primeira avaliação, para calos a variável oxidação não apresentou diferença significativa, já para a variável área dos calos coberta por plantas, houve maior cobertura no tratamento de LED+BRANCA não diferindo significativamente do tratamento de luz LED (tabela 2).

Para discos foliares, a variável oxidação foi significativamente maior no tratamento de luz BRANCA. Já para a área coberta por plantas, a luz branca não diferindo estatisticamente da luz LED obtiveram melhores resultados (tabela 3).

Tabela 2: Resultado da análise estatística das variáveis oxidação e área coberta por plantas dos calos da variedade SP803280 submetidos à diferentes qualidades de luz aos 30 dias

Oxidação	
Tratamento	Médias das notas atribuídas
LED+BRANCA	1,08 a
LED	1,10 a
BRANCA	1,18 a
Área coberta por plantas	
BRANCA	2,32 a
LED	2,48 ab
LED+BRANCA	2,64 b

* ANAVA com $p=0.13$ / $p=0.0063$

** Medias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância

Tabela 3: Resultado da análise estatística das variáveis oxidação dos discos da variedade SP803280 submetidos à diferentes qualidades de luz aos 30 dias

Tratamento	Médias
Oxidação	
LED + BRANCA	2,48 a
LED	2,85 a
BRANCA	3,80 b
Área coberta por plantas	
BRANCA	1,23 a
LED	1,75 b
LED+BRANCA	1,95 b

* ANAVA com $p=0.001$ / $p=0.0068$

** Medias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância

Na avaliação dos 90 dias de inoculação, para calos os tratamentos BRANCA e LED + BRANCA não diferiram estatisticamente e apresentaram a maior média de cobertura de brotações comparado ao tratamento de luz LED. Para o tamanho médio das plantas, o tratamento LED +

BRANCA apresentou o melhor resultado comparado aos demais tratamentos (tabela 4).

Para discos, os tratamentos não diferiram estatisticamente para área coberta por plantas. Já para a variável tamanho médio das plantas, o tratamento BRANCA seguido e não diferindo do LED foram os que apresentaram maiores médias e melhores resultados (tabela 5).

Levando-se em conta todas as avaliações, têm-se que para calos os melhores tratamentos para a regeneração e crescimento das plantas foram os em que o material foi exposto à luz branca e às luzes LED em conjunto com a branca. Estes tratamentos apresentaram uma oxidação inicial maior, porém seguida de uma maior cobertura do material por plantas e maior tamanho destas no final do experimento (figura 4 - A, C e E).

Já para discos foliares, também levando em conta todas as avaliações, têm-se que a luz branca proporcionou uma maior oxidação inicial, mas na outra avaliação nos tratamentos de luzes LED e LED e branca a área coberta por plantas foi maior. Quanto à área de cobertura do material por plantas na segunda avaliação nenhum tratamento se destacou, porém para o maior tamanho médio das plantas os tratamentos de luz led e de luz branca obtiveram melhores resultados (figura 4 - B, D e F).

Tabela 4: Resultado da análise estatística das variáveis área coberta por plantas e tamanho médio das plantas regeneradas de calos da variedade SP803280 submetidos à diferentes qualidades de luz aos 90 dias

Tratamento	Médias de altura
Área coberta por plantas	
LED	1,72 a
BRANCA	2,42 b
LED + BRANCA	2,63 b
Tamanho médio das plantas	
LED	1,76 a
BRANCA	2,24 b
LED + BRANCA	3,08 c

* ANAVA com $p=0.00$ / $p=0.00$

** Medias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância

Tabela 5: Resultado da análise estatística das variáveis área coberta por plantas dos discos da variedade SP803280 submetidos à diferentes qualidades de luz aos 90 dias

Tratamento	Médias de altura
Área coberta por plantas	
LED	2,33 a
BRANCA	2,88 a
LED + BRANCA	3,16 a
Tamanho médio das plantas	
LED + BRANCA	2,00 a
LED	2,41 ab
BRANCA	2,76 b

* ANAVA com $p=0.06$ / $p=0.01$

** Médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância

Resultados obtidos por SILVA et al. (2014), indicaram que plântulas de cana *in vitro*, quando expostas a diferentes quantidades de luzes LED monocromáticas azuis e vermelhas, na razão A/V= 70/30 apresentaram melhoria significativa no crescimento (maior peso fresco) e morfogênese (maior número de perfilhos e taxa de multiplicação), quando comparado com os demais tratamentos.

Estudos realizados com cana em bioreatores de imersão contínua, mostraram em mudas de cana-de-açúcar da variedade CTC07 uma maior produção de plantas em luz fluorescente branca quando comparadas à diferentes proporções de comprimentos de onda de luzes LEDs vermelhas e azuis. Os resultados deste estudo corroboram os encontrados neste trabalho em que a luz branca proporcionou maior quantidade mas não o maior tamanho das plantas (Maluta et al, 2011).

Figura 4: Aspecto visual das plantas regeneradas dos tratamentos de diferentes qualidades de luz aos 90 dias da data de inoculação. A- Calos do tratamento de luz Branca. B- Discos do tratamento de luz branca. C- Calos do tratamento de luz LED. D- Discos do tratamento de luz LED. E- Calos do tratamento de luzes LED e branca. F - Discos do tratamento de luzes LED e branca.

Já um estudo com algodoeiro herbáceo mostrou que a razão de 1:1 entre LEDs azul e vermelho é adequada para o aumento do peso fresco e peso seco, que a luz LED vermelho é eficaz para o crescimento da raiz e o LED azul é importante para a síntese de clorofila e desenvolvimento de estômatos (LI; XU; TANG, 2010). Os mesmos autores trabalhando com *Brassica napus*, concluíram que o uso de uma fonte de luz LED foi boa para promover a diferenciação, proliferação e crescimento de plântulas, a razão de LED azuis e vermelhas de 3:1 foi a mais adequada para a cultura (LI; TANG; XU, 2013). Nestes estudos a luz fluorescente branca foi utilizada como tratamento controle por ser a mais comumente utilizada em sala de crescimento nos laboratórios de cultura de tecidos.

Para este estudo, recomenda-se que para calos da variedade SP803280, as luzes fluorescente branca e a combinação desta com a luz LED proporcionou uma maior e melhor regeneração de plantas. Já para discos a luz LED e a luz fluorescente branca separadamente regeneraram maiores e melhores plantas.

3.3.2 Teste de resistência à concentrações distintas de genética

Considerando que a recomendação da literatura, indica como dose letal aquela que mata aproximadamente metade da população de uma amostra as avaliações e conclusões deste item foram realizadas.

Quando calos foram inoculados e acompanhados em meio de regeneração com diferentes concentrações de genética, observou-se que a princípio 60 e 50 mgL⁻¹, considerando a conversão, foram mais eficientes, porém a mortalidade nestes dois tratamentos foi maior que 50% (tabela 6). Desta maneira, o tratamento mais recomendado nesta avaliação então, seria o de 40 mgL⁻¹ considerando a conversão, não diferindo estatisticamente do de 60mgL⁻¹ sem conversão. Na segunda avaliação aos 60 dias, quanto ao número de calos regenerados, obteve-se o mesmo resultado apresentado anteriormente, levado em consideração a quantidade de plantas maiores que 2 cm regeneradas a partir destes, os tratamentos intermediários não

apresentaram diferenças significativas na média da quantidade de plantas regeneradas como pode ser observado na tabela 6, o aspecto visual dos melhores calos de cada tratamento é apresentado na figura 5.

Como pode ser observado na tabela 7, quanto as plântulas, aos 30 dias a concentração de 50 mgL^{-1} considerando a conversão se mostrou mais adequada com apenas 44% de sobrevivência das plantas e apresentando enraizamento 80% das plantas que se mantiveram vivas. Já na segunda avaliação, as concentrações de 40 e 50 mgL^{-1} se mostraram mais promissoras na seleção das plantas matando cerca de 40% das plantas, porém, uma concentração entre 40 e 50 mgL^{-1} de geneticina seria mais viável para a seleção destas, pois é uma concentração intermediária entre as que geraram sobrevivências de 60 e 28%, respectivamente, o aspecto visual das melhores plantas de cada tratamento em cada avaliação é apresentado na figura 6.

Vários trabalhos relatam testes como o realizado para a avaliação da melhor concentração de antibióticos a serem empregado após o processo de transformação genética de cana-de-açúcar de distintas variedades. As variedades RB855536, Q117, Q208 e KQ228, por exemplo apresentaram resultados semelhantes ao deste trabalho, pois a concentração adequada à seleção dos transgênicos é a de 50 mgL^{-1} (BASNAYAKE; MOYLE; BIRCH, 2011; BELINTANI et al., 2012; JOYCE et al., 2014). Já as variedades L 79-1002, Ho 00-961, e CP-88-1762 em trabalhos realizados por KIM; GALLO; ALTPETER, (2012); XIONG et al., (2013); e FOUAD et al.,(2015), se mostraram mais sensíveis ao antibiótico sendo que a concentração avaliada como melhor ficou entre 20 e 30 mgL^{-1} .

Tabela 6: Taxa de regeneração de calos de cana-de-açúcar da variedade SP803280 após 30 e 60 dias da data de inoculação e número de plantas regeneradas em cada tratamento com diferentes concentrações de genética

Tratamento		Taxa de regeneração % (número de calos regenerados)	Taxa de regeneração % (número de calos regenerados)	Média do número de plantas regeneradas maiores que 2 cm
		30 dias	60 dias	60 dias
Controle		96 (24) e	100 (25) d	4.4 e
Genética sem conversão	30 mgL ⁻¹	92 (23) d	92 (23) de	3,6 de
	40 mgL ⁻¹	76 (19) cd	76 (19) cd	2,4 bcd
	50 mgL ⁻¹	92 (23) d	92 (23) d	2 abc
	60 mgL ⁻¹	48 (12) bc	48 (12) bc	1,4 ab
Genética com conversão	30 mgL ⁻¹	76 (19) cd	76 (19) cd	1,6 ab
	40 mgL ⁻¹	48 (12) bc	48 (12) bc	3,2 cde
	50 mgL ⁻¹	24 (6) a	24 (6) a	1,4 ab
	60 mgL ⁻¹	8 (2) ab	8 (2) ab	1 a

* Médias comparadas por ANAVA seguida pelo teste de Tukey 5% de significância, letras diferentes significam diferença significativa.

** p= 0,000 em todos os testes realizados.

Tabela 7: Taxa de sobrevivência e enraizamento de plântulas de cana-de-açúcar da variedade SP803280 após 30 e 60 dias da data de inoculação e número de plantas regeneradas em cada tratamento com diferentes concentrações de genética

Tratamento		Taxa de sobrevivência % (número de plântulas vivas) 30 dias	Taxa de enraizamento % (numero de plântulas enraizadas) 30 dias	Taxa de sobrevivência % (número de plântulas vivas) 60 dias	Taxa de enraizamento % (número de plântulas enraizadas) 60 dias
Geneticina sem conversão	Controle	100 (25) d	100 (25) e	100 (25) c	100 (25) d
	30 mgL ⁻¹	68 (17) bc	84 (21) bc	84 (21) cd	56 (16) d
	40 mgL ⁻¹	76 (19) cd	80 (20) bc	72 (18) bc	68 (8) abc
	50 mgL ⁻¹	76 (19) cd	80 (20) bc	68 (17) bc	60 (5) ab
	60 mgL ⁻¹	76 (19) cd	76 (19) bc	76 (19) bc	48 (2) a
Geneticina com conversão	30 mgL ⁻¹	68 (17) bc	72 (18) b	60 (15) b	64 (14) cd
	40 mgL ⁻¹	60 (15) abc	76 (19) bc	64 (16) bc	32 (17) cd
	50 mgL ⁻¹	44 (11) ab	40 (10) a	28 (7) a	20 (15) bcd
	60 mgL ⁻¹	32 (8) ab	28 (7) a	20 (5) a	8 (12) abcd

* Médias comparadas por ANAVA seguida pelo teste de Tukey 5% de significância, letras diferentes significam diferença significativa.

** p= 0,000 em todos os testes realizados.

Figura 5: Aspecto visual dos calos embriogênicos de cana-de-açúcar da variedade SP803280 submetidos aos tratamentos com diferentes concentrações de geneticina. A: tratamento controle (30 dias); B: 30mgL⁻¹ de geneticina sem conversão (30 dias); C: 40mgL⁻¹ de geneticina sem conversão (30 dias); D: 50mgL⁻¹ de geneticina sem conversão (30 dias); E: 60mgL⁻¹ de geneticina sem conversão (30 dias); F: 30mgL⁻¹ de geneticina com conversão (30 dias); G: 40mgL⁻¹ de geneticina com conversão (30 dias); H: 50mgL⁻¹ de geneticina com conversão (30 dias); I: 60mgL⁻¹ de geneticina com conversão (30 dias); J: tratamento controle (60 dias); K: 30mgL⁻¹ de geneticina sem conversão (60 dias); L: 40mgL⁻¹ de geneticina sem conversão (60 dias); M: 50mgL⁻¹ de geneticina sem conversão (60 dias); N: 60mgL⁻¹ de geneticina sem conversão (60 dias); O: 30mgL⁻¹ de geneticina com conversão (60 dias); P: 40mgL⁻¹ de geneticina com conversão (60 dias); Q: 50mgL⁻¹ de geneticina com conversão (60 dias); R: 60mgL⁻¹ de geneticina com conversão (60 dias).

Figura 6: Aspecto visual das plântulas de cana-de-açúcar da variedade SP803280 submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de geneticina. A: tratamento controle (30 dias); B: 30mgL⁻¹ de geneticina sem conversão (30 dias); C: 40mgL⁻¹ de geneticina sem conversão (30 dias); D: 50mgL⁻¹ de geneticina sem conversão (30 dias); E: 60mgL⁻¹ de geneticina sem conversão (30 dias); F: 30mgL⁻¹ de geneticina com conversão (30 dias); G: 40mgL⁻¹ de geneticina com conversão (30 dias); H: 50mgL⁻¹ de geneticina com conversão (30 dias); I: 60mgL⁻¹ de geneticina com conversão (30 dias); J: tratamento controle (60 dias); K: 30mgL⁻¹ de geneticina sem conversão (60 dias); L: 40mgL⁻¹ de geneticina sem conversão (60 dias); M: 50mgL⁻¹ de geneticina sem conversão (60 dias); N: 60mgL⁻¹ de geneticina sem conversão (60 dias); O: 30mgL⁻¹ de geneticina com conversão (60 dias); P: 40mgL⁻¹ de geneticina com conversão (60 dias); Q: 50mgL⁻¹ de geneticina com conversão (60 dias); R: 60mgL⁻¹ de geneticina com conversão (60 dias).

3.3.3 Transformação genética com o gene *AtDdm1*

Foram realizados um total de 19 experimentos de transformação genética com o gene *AtDdm1*, destes o único experimento que apresentou plantas positivas que se mantiveram estáveis nas demais PCRs realizadas foi o efetuado em 28/08/2014. O gel abaixo (figura 7) representa o resultado da terceira PCR realizada nos perfilhos das plantas transgênicas. Nota-se que apenas 2 perfilhos das 7 que regeneraram do bombardeamento se mantiveram estáveis e estes são derivados das plantas 3 e 6 que apresentaram resultado positivo na primeira PCR. Na figura 8 pode-se observar que nenhuma das plantas que apresentaram resultado positivo para o gene *AtDdm1* possui o gene de resistência. A tabela 8 demonstra a taxa de eficiência do procedimento.

Figura 7: Gel de agarose 1% da reconfirmação de perfilhos de plantas transgênicas estáveis derivadas do bombardeamento realizados no dia 28/08/2014. 1Kb (1Kb ladder plus); C- (controle negativo); C+ (controle positivo); WT (planta controle); a numeração corresponde aos perfilhos relativos aos eventos transgênicos do bombardeamento realizado em 28/08/2014.

Figura 8: Gel de agarose 1% da PCR para o gene *neo* realizada em plantas transgênicas para o gene *AtDdm1* derivadas do bombardeamento realizado no dia 28/08/2014. 1Kb (1Kb ladder plus); C- (controle negativo); C+ (controle positivo); WT (planta controle); P15 - planta controle positivo para o gene *neo*; D3 e D6, plantas positivas para o gene *AtDdm1*.

Tabela 8: Eficiência de regeneração e transformação relativa ao bombardeamento com gene *AtDdm1* realizado em 28/08/14

Explante	Número de placas bombardeadas	Número de calos por placa	Plantas regeneradas em meio seletivo	Número de plantas analisadas	Plantas PCR (+) gene <i>AtDdm1</i>	Eficiência gene <i>AtDdm1</i> (%)
Calos	4	80	7	7	2	2,5
Total	4	320	7	7	2	2,5

^a A eficiência de transformação (%) é dada pelo total de plantas PCR positivo para os transgenes *AtDdm1* dividido pelo número de calos presentes em cada placa que foram submetidos ao bombardeamento

Esta eficiência de transformação é semelhante do que a obtida por (PICELLI, 2010) que transformou as variedades RB835089 e RB835486 com o mesmo gene *AtDdm1* e conseguiu valores de 2 e 4,2% respectivamente. Os

resultados também podem ser comparados com os 1,12% obtidos por (BARBOSA, 2010) transformação genética da variedade RB835486 com gene que codifica para a enzima ComtAS, e com a faixa de 0,42 à 2,22% de Melotto-Passarim, (2009) com a variedade RB835089 e o gene AtBi ambos utilizando o gene *neo* em cotransformação. Já Joyce et al (2014), em transformação do genótipo CP-88-1762 com o gene *neo* conseguiu uma eficiência variando entre 4 e 5%. A porcentagem de transformação além de ser genótipo dependente ainda é ligada à qualidade do material que está sendo utilizado, o modo de preparo do DNA e das partículas além de fatores relacionados ao manipulador e ao bombardeador de partículas em si.

3.3.4 Transformação genética com o gene *xth*

Foram realizados um total de 21 experimentos de transformação genética com o gene *xth*, destes apenas 4 experimentos apresentaram plantas positivas que se mantiveram estáveis nas demais PCRs. Os experimentos foram realizados nas seguintes datas: 20/06/2014, 27/06/2014, 11/03/2015 e 25/03/2015. As figuras 9 e 10 representam o resultado da terceira PCR realizada nos perfilhos das plantas transgênicas que foram selecionadas em meio seletivo e confirmadas através de PCR. Foi realizado o PCR para a confirmação da presença do gene de resistência nas plantas positivas, porém, como pode ser observado na figura 11, nenhuma destas apresentou bandas no tamanho de 550pb esperado para o gene *neo*. A eficiência de transformação dos experimentos citados é demonstrada na tabela 9.

Figura 9: Gel de agarose 1% da reconfirmação de perfilhos de plantas transgênicas estáveis derivadas dos bombardeamentos realizados nos dias 20/06/2014 e 27/06/2014. 1Kb (1Kb ladder plus); C- (controle negativo); C+ (controle positivo); WT (planta selvagem); a numeração corresponde aos perfilhos das plantas selecionadas.

Figura 10: Gel de agarose 1% da confirmação de plantas transgênicas derivadas dos bombardeamentos realizados nos dias 11/03/2015 e 25/03/2015. 1Kb (1Kb ladder plus); C- (controle negativo); C+ (controle positivo); WT (planta controle); a numeração corresponde aos perfilhos das plantas selecionadas.

Figura 11: Gel de agarose 1% da PCR para o gene *neo* realizada em plantas transgênicas para o gene *xth*. 1Kb (1Kb ladder plus); C- (controle negativo); C+ (controle positivo); WT (planta controle); P15 - planta controle positivo para o gene *neo*; Plantas positivas para o gene *xth*.

Tabela 9: Eficiência de regeneração e transformação relativa aos experimentos de transformação genética via biobalística com o gene *xth*

Experimento	Número de placas bombardeadas	Número de calos por placa	Plantas regeneradas em meio seletivo	Número de plantas analisadas	Plantas PCR (+) gene <i>xth</i>	Eficiência gene de interesse (%)
1 - 20/06/2014	7	80	61	61	2	2,5
2 - 27/06/2014	7	80	29	29	4	5
3 - 11/03/2015	5	60	370	370	11	18,3
4 - 25/03/2015	5	60	135	135	3	5
Total	24	280	595	595	20	-

^a A eficiência de transformação (%) é dada pelo total de plantas PCR positivo para os transgenes *xth* dividido pelo número de calos presentes em cada placa que foram submetidos ao bombardeamento multiplicado por 100.

Houve grande variação nas eficiências de transformação o que se deve principalmente a qualidade do material bombardeado pois a cada experimento foram utilizados calos derivados de inoculações de discos foliares distintas o que acarreta na aquisição de maior ou menor potencial embriogênico. Este resultado foi

semelhante ao encontrado para a variedade SP80-180 cotransformada com os genes *neo* e *bar* foram encontradas eficiências variáveis de (2 à 30% para ambos os genes) acordo com as datas dos experimentos fato que também foi atribuído ao material utilizado no bombardeamento (FALCO; TULMANN NETO; ULIAN, 2000). Rani; Sandhu; Gosal, (2012), transformaram o genótipo de cana Col83 com o gene *OsglyII* responsável pelo aumento da tolerância à salinidade em arroz em cotransformação com o gene *gus* e alcançou 0,3% e 8,13% de eficiência, respectivamente. No mesmo ano Taparia; Fouad e Gallo (2012), obtiveram na transformação da variedade CP88-1762 com cassete mínimo contendo apenas o gene *neo* uma eficiência de 10%. Mais recentemente, Fouad et al. (2015) encontraram uma eficiência de 2% com o mesmo tipo de cassete.

A comparação dos resultados mostram que a transformação genética de cana-de-açúcar é sujeita à diversas variáveis desde genótipos ao tempo de inoculação e qualidade do material.

3.4 Conclusões

Para calos da variedade SP803280, a qualidade de luz branca e a combinação desta com a LED proporcionaram um incremento de regeneração de plantas em média 35% maior comparado com apenas a LED.

Para discos foliares da variedade SP803280 a junção das luzes LED e branca proporcionaram um crescimento das plantas 20,28% maior em comparação com os tratamentos de luzes individuais.

Tanto para calos quanto para plântulas, uma concentração entre 40 e 50 mgL⁻¹ de geneticina considerando a potencia fornecida pelo fabricante é a suficiente para selecionar aproximadamente 50% do material vegetal não transgênico e é a recomendada para ser utilizada na seleção de material geneticamente transformado da variedade SP803280.

A eficiência de transformação para o gene *AtDdm1* foi de 2,5% em apenas um bombardeamento.

A transformação genética utilizando o plasmídeo pHAC17L1_XTH obteve eficiências variáveis de acordo com o bombardeamento realizado variando de 2,5 a 18,3% de plantas positivas.

Referências

BASNAYAKE, S.W.V.; MOYLE, R.; BIRCH, R.G. Embryogenic callus proliferation and regeneration conditions for genetic transformation of diverse sugarcane cultivars. **Plant Cell Reports**, Berlim, v. 30, n. 3, p. 439–448, 2011.

BARBOSA, A. L. **Cultura de tecidos e regeneração de plantas transgênicas a partir de calos embriogênicos e de folhas imaturas de cana-de-açúcar**, 135 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010

BELINTANI, N. G.; GUERZONI, J. T. S.; MOREIRA, R. M. P.; VIEIRA, L. G. E. Improving low-temperature tolerance in sugarcane by expressing the ipt gene under a cold inducible promoter. **Biologia Plantarum**, Zurich, v. 56, n. 1, p. 71–77, 2012.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_12_17_09_03_29_boletim_cana_portugues_-_3o_lev_-_15-16.pdf>. Acesso em: 11 fev. 2015.

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**, Berlim, v. 19, n. 12, p. 1188–1194, 2000

FOUAD, W. M.; HAO, W.; XIONG, Y.; STEEVES, C.; SANDHU, S. K.; ALTPETER, F. Generation of Transgenic Energy Cane Plants with Integration of Minimal Transgene Expression Cassette. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, Beijing, p. 407–413, 2015.

JOYCE, P.; HERMANN, S.; CONNELL, A. O.; DINH, Q.; SHUMBE, L.; LAKSHMANAN, P. Field performance of transgenic sugarcane produced using Agrobacterium and biolistics methods. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, p. 411–424, 2014.

KIM, B.R.; NAM, H.Y.; KIM, S.U.; KIM, S.I.; CHANG, Y.J. Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice. **Biotechnology Letters**, Birmingham, v. 25, n. 21, p. 1869–1872, 2003.

LI, H.; XU, Z.; TANG, C. Effect of light-emitting diodes on growth and morphogenesis of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plantlets in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dijon, v. 103, n. 2, p. 155–163, 2010.

LI, H.; TANG, C.; XU, Z. The effects of different light qualities on rapeseed (*Brassica napus* L.) plantlet growth and morphogenesis in vitro. **Scientia Horticulturae**, British Columbia, v. 150, p. 117–124, 2013.

Maluta, F.A ; Bordignon, S.R. ; Marques, N.L ; Takeuti, Bruna ; RODRIGUES, P. H. V. . Avaliação do uso de LEDs (Light Emitting Diodes) no cultivo in vitro de cana de açúcar.. In: **XVIII Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais e**

V Congresso Brasileiro de Cultura de Tecido de Plantas, Joinville, v.1, p. 134-139, 2011.

MELOTTO-PASSARIN, D.M. **Transformação genética de cana-de-açúcar por biolística e *Agrobacterium tumefaciens* visando estudar o mecanismo de morte celular programada**. 2009. 159 p. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba 2009. 68

MOYLE, R.L.; BIRCH, R.G. Sugarcane loading stem gene promoters drive transgene expression preferentially in the stem. **Plant Molecular Biology**, Bethesda, v. 82, n. 1/2, p. 51–58, 2013.

PICELLI, E.C.M. **Cultura de tecidos e transformação genética com o gene Ddm1 no estudo do silenciamento de elementos de transposição**. 2010. 140 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

RANI, K.; SANDHU, S.K.; GOSAL, S.S. Genetic augmentation of sugarcane through direct gene transformation with osgly II gene construct. **Sugar Tech**, Uttar Pradesh, v. 14, n. 3, p. 229–236, 2012.

SILVA, M.M.A.; OLIVEIRA, A.L.B. DE; OLIVEIRA-FILHO, R.A.; GOUVEIA-NETO, A.S.; CAMARA, T.J.R.; WILLADINO, L.G. Effect of blue/red LED light combination on growth and morphogenesis of *Saccharum officinarum* plantlets in vitro. **Progress in Biomedical Optics and Imaging**, Bellingham, v. 8947, p. 89471X, 2014.

SINGH, R.K.; KUMAR, P.; TIWARI, N.N.; RASTOGI, J.; SINGH, S.P. Current status of sugarcane transgenic: an overview. **Advancements in Genetic Engineering**, Morgantown v. 2, n. 2, p. 1–7, 2013.

TAPARIA, Y.; FOUAD, W.M.; GALLO, M. Rapid production of transgenic sugarcane with the introduction of simple loci following biolistic transfer of a minimal expression cassette and direct embryogenesis. **In vitro cellular developmental biology**, Columbia, v. 48, p.15–22, 2012

XIONG, Y.; JUNG, J.; ZENG, Q.; GALLO, M.; ALTPETER, F. Comparison of procedures for DNA coating of micro-carriers in the transient and stable biolistic transformation of sugarcane. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dijon, v. 112, n. 1, p. 95–99, 2013.

4. VALIDAÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA PARA DETECÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS INSERIDAS POR PCR EM TEMPO REAL

Resumo

A transformação genética de cana-de-açúcar é uma realidade desde a década de 90, sendo cada vez mais promissora tendo em vista a demanda crescente do mercado por produtos sustentáveis. Neste processo, uma das etapas de mais difícil execução é a de detecção do número de cópias inseridas no genoma. Técnicas como o Southern blot são muitas vezes ineficazes, não proporcionando resultados ou mostrando hibridizações inespecíficas. Como alternativa à este método, com a utilização da tecnologia de PCR em tempo real, pode-se estimar o número de cópias inseridas baseado nos dados de amplificação do gene alvo no DNA da planta. Mas, para que se obtenha um resultado confiável, é necessário o rastreamento de genes de referência, que neste caso são os que apresentam cópia única ou poucas cópias estáveis no genoma da planta. Assim, os objetivos destes trabalhos foram a avaliação de tamanho e possível alteração do genoma por citometria de fluxo, a caracterização dos melhores genes de referência para quantificação de cópias por qRT-PCR nos eventos transgênicos nas variedades SP803280 transformada com os genes *AtDdm1* e *xth* e RB835089 transgênica para o gene *neo* e a quantificação do número de cópias inseridas por dois métodos de cálculo distintos. De acordo com os resultados obtidos, não houveram alterações de ploidia e tamanho do genoma nos transgênicos das duas variedades. Os genes *p4h* e *prr* foram os mais adequados para a quantificação relativa de genes inseridos na variedade SP803280 enquanto que para a RB835089 *aprt* e *prr* se mostram mais eficazes. A quantificação de genes inseridos é possível para as duas variedades e todos os genes testados, porém as metodologias testadas de cálculo geram resultados distintos. De maneira geral, o método proposto por Xue e colaboradores que apresenta uma maneira absoluta de cálculo, apresentou resultados maiores quando comparados ao relatado por Casu que apresenta uma quantificação relativa do número de cópias em relação ao gene de referência utilizado.

Palavras chave: Transgênicos; cana-de-açúcar; quantificação de genes inseridos; DNA

Abstract

Genetic transformation of sugarcane is a reality since the 90s, and it has become increasingly promising, considering the growing market demand for sustainable products. Within this process, one of the harder stages of execution is the detection of the number of copies inserted into the genome. Techniques such as Southern blot are frequently ineffective, and do not provide results or show unspecific hybridizations. As an alternative to this method, the use of real-time PCR technology allows the estimation the number of copies inserted based on the target gene amplification data at the plant DNA. However, in order to obtain a reliable result, the tracking of reference genes, which in this case are those with a single copy or a few stable copies in the plant genome, is necessary. The aims of these studies were the

evaluation of the size and possible modification of the genome through flow cytometry, the characterization of the best reference genes for quantification of copies by qRT-PCR in the transgenic events in SP803280 varieties transformed with *AtDdm1* and *xth* genes and RB835089 transgenic for the *neo* gene, and the quantification of the number of copies inserted through two distinct calculation methods. According to the obtained results, there were no ploidy and genome size alterations in the transgenic from both varieties. Genes *p4h* and *prp* were the most suitable for the relative quantification of inserted genes in SP803280 variety, while for RB835089 *aprt* and *prp* were shown to be more effective. The quantification of inserted genes is possible for both varieties and for all of the tested genes, but the calculation methodologies tested provided distinct results. In a general way, the method proposed by Xue and collaborators where an absolute calculation way is presented, provided better results when compared to the method proposed by Casu, which presents a relative quantification of the number of copies in relation to the reference gene used.

Keywords: Transgenic; sugarcane; inserted gene determination; DNA

4.1 Introdução

Durante o processo de análise de plantas geneticamente modificadas, a etapa de verificação do número de cópias inseridas é de fundamental importância principalmente quando se trata de transformação de espécies de interesse comercial. Para a liberação da comercialização e plantio destas, a integração, estabilidade e localização dos genes inseridos precisam ser verificados e analisados criteriosamente para fins de regulamentação.

Técnicas como o southern blot são comumente utilizadas para o rastreamento do número de cópias em várias espécies vegetais. Esta envolve o isolamento do DNA genômico que é cortado com enzimas de restrição e os fragmentos gerados são separados por eletroforese em gel, transferidos para uma membrana carregada positivamente e hibridizados com sondas específicas (SOUTHERN, 1975). O procedimento requer relativamente grandes quantidades de DNA genômico e a utilização de nucleotídeos marcados radiativamente ou reagentes quimioluminescentes. Assim, se torna um processo demorado e muitas vezes ineficiente para a avaliação das populações de plantas transgênicas principalmente de cana-de-açúcar (CASU; SELIVANOVA; PERROUX, 2012).

Trabalhos tem sido desenvolvidos no intuito de estabelecer uma metodologia de fácil detecção da inserção de genes em cana-de-açúcar. Estes tem

mostrado que, a PCR em tempo real (qRT-PCR) é uma técnica precisa na análise da detecção da inserção de genes devido às suas características simples, reprodutíveis e de alto rendimento, além de ser um método de baixo custo e amplamente aceito no acompanhamento dos níveis de expressão do gene em organismos geneticamente modificados (LING et al., 2014). Assim, tanto em casos de rastreamento de genes quanto de expressão gênica, a fim de se obter uma análise confiável precisa-se haver uma comparação com genes de referência que devem servir como controle interno para normalizar e controlar a variação entre as amostras e reações (WAN et al., 2010; SANTIS, DE; SMITH-KEUNE; JERRY, 2011).

Deste modo este trabalho objetivou a validação de genes de referência para análise do número de cópias inseridas em duas variedades de cana-de-açúcar e posterior quantificação em transgênicos derivados das mesmas.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Local dos experimentos e variedades utilizadas

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC), localizado na Escola Superior de Agricultura da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP).

Para os experimentos de validação de genes de referência, quantificação de número de cópias foram realizados com plantas de cana-de-açúcar controle e transgênicas mantidas em casa de vegetação das variedades RB835089 e SP803280.

4.2.2 Citometria de fluxo para análise de tamanho do genoma

A citometria de fluxo é uma técnica baseada no emprego de laser óptico amplamente utilizado para triagem, contagem individual de células e detecção de biomarcadores em proteínas. A técnica por meio de um feixe de laser incidente faz a medição da dispersão e da fluorescência do feixe de laser refletido, a partir da amostra celular. A técnica realiza a rápida identificação de células no instante que estas passam através de um aparelho de detecção eletrônica em uma corrente líquida. Após a separação individual celular é feita a análise, contagem, e

qualificação das micropartículas suspensas em fluxo, em meio líquido. Desse modo, realiza com rapidez a identificação de inúmeras características biológicas contidas nas células como: os ácidos nucleicos, receptores de superfície, síntese de proteínas, de citocinas, e concentração de íons, ao mesmo tempo dentro de uma célula única.

Para este trabalho, as amostras de folhas de plantas controle das variedades RB835089 e SP803280 e das transgênicas para o gene *xth* sendo estas os eventos XA7P2, A14P5 e XP30 e para o gene *AtDdm1*, eventos DP3 e DP6 foram enviadas para a empresa Markgene (Rio Claro - SP) para avaliação de tamanho e alteração do genoma.

As amostras de folhas utilizadas neste experimento foram usadas para o preparo de suspensões celulares preparadas de acordo com o seguinte procedimento. Aproximadamente 1 cm² de folha foi picado com auxílio de um bisturi por 30 a 50 vezes dentro de placa de Petri de vidro contendo 0,2 ml solução tampão de extração de núcleos que consiste do Tampão Marie's (50 mM glucose, 15 mM NaCl, 15 mM KCl, 5 mM EDTA Na₂, 50 mM sodium citrate, 0.5% Tween 20, 50 mM HEPES, pH 7.2) (MARIE; BROWN, 1993), acrescido de 1% de PVP. Após esta etapa, adicionou-se 0,2 ml solução tampão de extração de núcleos, acrescido de iodeto de propídeo (IP- marca Sigma) (100 µg/ml) e RNase (100 µg/ml). A solução foi filtrada em filtro 30 µm, o filtrado foi mantido no gelo e escuro durante mínimo de 30 min. As leituras foram feitas em um citometro FacScalibur (BD), usando os parâmetros Foward Scatter (FSC), Side Scatter (SSC) e a fluorescência do IP (canal FL2 - A).

Um mínimo de 1.000 núcleos foram contados em cada amostra, com análise no software CellQuest Software (Becton - Dickinson , San Jose , CA). Foram realizadas três repetições independentes, por amostra.

Os tamanhos de genoma das amostras de cana foram calculados em função dos seus picos e em relação ao pico do controle (tomate).

4.2.3 Validação de genes de referência

O DNA de plantas selvagens das variedades RB835089 e SP803280 foi extraído pelo método CTAB (descrito no item 3.2.4), quantificado em NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific) e em gel de agarose 1%.

Primers específicos para tempo real (produtos de até 200pb) foram sintetizados a partir da sequencias obtidas por CASU; SELIVANOVA; PERROUX, (2012) para os genes prolyl 4-hydroxylase (*p4h*), enolase (*enol*), thiosulfato sulfurtransferase (*tst*), antranilato fosforybosyltransferase (*aprt*), ciclina (*cyc*), pseudo regulador de resposta (*prr*), assim como os *primers* específicos para os genes *xth*, *AtDdm1* e *neo*.

Foram realizadas PCRs para a confirmação de tamanho e especificidade de anelamento com cada par de *primers*. Os que obtiveram resultados positivos para tamanho de banda esperado e amplificação específica foram selecionados para o experimento de PCR em tempo real.

Cada reação foi composta de 6,5 µL de 2x SYBR^(R) Green Master Mix 0,5 pmol de cada primer, 25 ng de DNA genômico em um volume final de 12,5 µL. As condições da corrida seguiram o seguinte protocolo: 55 °C por 2 minutos; 95 °C por 10 minutos; 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto e 1 ciclo de 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 15 segundos e 95 °C por 15 segundos este último para produzir a curva de dissociação. Para cada par de *primers* foram realizadas 3 reações para maior confiabilidade dos dados além do controle que consistiu da ausência de DNA na amostra. O equipamento utilizado para a realização da corrida foi o StepOne Plus® (Thermo Fisher Scientific).

Os dados de eficiência para cada curva gerada foram analisados no software LinRegPCR® 11.6 (RAMAKERS et al., 2003).

Tabela 1: *Primers* utilizados para a validação de genes de referencia em cana-de-açúcar e análise do número de cópias (adaptado de CASU; SELIVANOVA; PERROUX, 2012).

Genes	Fonte da sequencia ID	Genes modelo de sorgo	SoGI3.0 ID	Primer Foward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')	Tamanho do produto (pb)
PH4	Sb01g007280	Sb01g007280	TC125479	GCGACATCAGAACAGTGTGAA	TTGTACTCTCCGCGGTTTCT	110
<i>ENOL</i>	Sb02g023480	Sb02g023480	TC121179	TCCTTACAAAGGATGGGAGC	TGTACAGATCACCCAGACGC	96
<i>TST</i>	Sb08g020860	Sb08g020860	TC123190	ACATGCTGCCATCTGAAAAG	CAGCCCCTTTCCATCATAAA	95
<i>APRT</i>	Sof.223.1.S1_at	Sb02g033370	TC137307	TGACACATTCCCAACCTCAA	ATCTCTCTCCCTGAGTGGCA	119
<i>CYC</i>	Sof.2067.1.S1_a_at	Sb10g030790	TC138480	CTCATGGAAAACCTTACCGGG	TGCATCCAGCAAGAAAGTTG	95
<i>PRR</i>	Sof.1382.1.S1_at	Sb04g026190	TC1389903	GCCAAATTCAGGCAGAAAAG	CACCCTAGGCCTTGTTTCAG	96
<i>NEO</i>				GCCGAATATCATGGTGGAA	AATATCACGGGTAGCCAACG	106
<i>XTH</i>				GATGCTCACCTGTTGTTTG	GGCCACGAAGGCAACTA	98
<i>DDM1</i>				CTCACCTGTTGTTTGGTGTT	AATCACCGAGCCAAACAGTC	102

Adicionalmente, a mesma metodologia descrita por XUE et al. (2014), descrita no item 4.2.3 foi utilizada para o cálculo do número de cópias dos genes de cada gene de referência testado.

4.2.4 Cálculo do número de cópias inseridas

O mesmo protocolo de reação foi utilizado para as amostras de plantas transgênicas confirmadas para o gene AtDdm1, xth (variedade SP803280) e *neo* (variedade RB538059) com intuito de se quantificar o número de cópias inseridos no genoma por duas maneiras distintas.

O primeiro método foi descrito por CASU; SELIVANOVA; PERROUX (2012), e é calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$GCI = \text{Eff}^{\text{CT}} / \text{Eff}_{\text{Ref}}^{\text{CT}}$$

Em que:

GCI: índice de número de cópias

Eff^{CT} : Eficiência da amplificação do gene de alvo elevada ao valor do Ct gerado para cada uma das repetições

$\text{Eff}_{\text{Ref}}^{\text{CT}}$: Eficiência da amplificação do gene de referência elevada ao valor do Ct gerado para cada uma das repetições

O segundo, foi descrito por XUE et al. (2014), e leva em consideração o tamanho do genoma da cana-de-açúcar estudada e o nível de ploidia para o cálculo da seguinte maneira:

$$\text{Copias/genoma} = 10^{\text{Xt}} / [(\text{quantidade de DNA utilizada em cada reação (g)} \times 6.02 \times 10^{23}) / (\text{tamanho do genoma (Mbp)} \times 10^6 \times 660)]$$

Em que:

Xt: Ct gerado para cada uma das repetições

$6,02 \times 10^{23}$: constante de Avogadro

Mbp: Tamanho do genoma de cana-de-açúcar determinado por citometria de fluxo

660: peso molecular médio (MW) de um par de bases de DNA é de 660 daltons

Após o cálculo o resultado obtido no GCI foi multiplicado pela quantidade de cópias do gene de referência. Após este procedimento, houve também a multiplicação dos valores obtidos pela ploidia das variedades.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Citometria de fluxo para análise do tamanho e estabilidade do genoma

De acordo com as leituras dos picos realizados pelo citometro de fluxo, não houveram alterações na quantidade de DNA e ploidia das amostras controle compradas com as transgênicas (tabela 2).

Tabela 2: Resultado de tamanho de genoma e ploidia obtido pelas leituras de citometria de fluxo das amostras controle e transgênicas para os genes *neo*, *AtDdm1* e *xth*.

Tratamento	Leitura média	Tamanho de genoma	
	Citometria	Mb (2C)	pg (2C)
<i>Solanum Lycopersicum</i> L. (linh.			
17388)	24,6730	1900	1,96
WTRB	90,2160	6947	7,16
RB P16	87,2360	6718	6,93
WTSP	90,7440	6988	7,20
SP D3	89,6900	6907	7,12
SPD6	91,6120	7055	7,27
SPXA7P2	93,5600	7205	7,43
SPXA14P5	90,9320	7002	7,22
SPXP30	93,8500	7227	7,45

Observa-se que as variedades estudadas são heptaplóides e que a variedade RB835089 possui genoma com tamanhos médio de 6833 Mb, enquanto a SP803280 um de 7064Mb. Estes resultados foram utilizados para o cálculo da quantidade de número de cópias por genoma estabelecido por XUE et al.,(2014).

Em trabalho realizado com o intuito de rastrear a quantidade de DNA presente em genomas de cana-de-açúcar derivadas de cruzamentos interespecíficos de *Saccharum officinarum* e *Saccharum spontaneum*, mantidas em diferentes

estados americanos, ZHANG et al., (2012), encontraram grande variação tanto do conteúdo como de ploidia entre os híbridos. Para os pertencentes à *Saccharum officinarum*, obtiveram resultados de ploidia variando entre 7,67 à 11,98 pg/2C e conteúdo de 7189 à 11697 Mb, respectivamente, com uma média de 9676,64 Mb que pode ser atribuída à maior parte dos híbridos. Já para os de *Saccharum spontaneum*, tem-se uma variação de 3,44 pg/2c com 2893 Mb à 11,26 pg/2C com 10563Mb, com média de 6196,78 Mb.

O trabalho citado traz a avaliação da base genética dos híbridos utilizados neste trabalho, e plantados no Brasil. A ampla variação no conteúdo de DNA e ploidia se deve aos próprios programas de melhoramento da espécie. Sendo necessária a confirmação destes parâmetros em cada variedade para a estimativa do número de cópias dos genes endógenos e inseridos de maneira confiável.

4.3.2 Validação de genes de referência

Nas PCRs realizadas para os genes de referência com a planta selvagem e transgênicas tanto para a variedade SP803280 e RB835089 apenas o gene *tst* apresentou banda fora do tamanho esperado (Figura 1). Observa-se também, a variação de intensidade das bandas de acordo com cada gene testado o que pode ser relacionado com a quantidade de cópias de cada um presente no genoma. Sendo assim, os procedimentos de qRT-PCR não foram realizados para o gene *tst*.

Figura 1: PCR para verificação da especificidade e tamanho de banda esperado (especificados na tabela 1) dos *primers* desenhados para qRT-PCR da variedade SP803280 (A) e RB835089 (B). C- controle negativo da reação; WT - planta controle; D+ planta transgênica para o gene *AtDdm1*; X+ planta transgênica para o gene *xth*; 16 e 19 plantas positivas para o gene *neo*.

Os resultados de PCR em tempo real, as curvas de dissociação para todos os pares de *primers* testados apresentaram apenas 1 pico para as duas variedades testadas como pode ser observado nas figuras 2 e 3 atestando que não houve pareamento inespecífico. Assim os procedimentos de análise do número de cópias de cada gene endógeno pelo método descrito no item 4.2.4 pode ser realizado.

FIGURA 2: Curvas de dissociação geradas para os genes de referência testados para a variedade SP803280. A: *apt*; B: *cyc*; C: *enol*; D: *gapdh*; E: *p4h*; F: *pr*.

FIGURA 3: Curvas de dissociação geradas para os genes de referência da variedade RB835089. A: *aprt*; B: *cyc*; C: *eno1*; D: *gapdh*; E: *p4h*; F: *prp*.

A tabela 2 mostra as eficiências médias de cada *primer* e seu respectivo ct médio para as variedades SP803280 e RB835089. O teste de Tukey à 5% de significância mostrou que não houve diferença estatística para a eficiência dos *primers* na variedade SP803280 ($p=0,31$) ao contrário da variedade RB835089 ($p=0,0001$). Já para a variável Ct houve diferença estatística nos testes realizados dentro das duas variedades. Este fato atesta que os *primers* além de específicos amplificam genes que não possuem o mesmo número de cópias no genoma, sendo necessário a escolha do gene de referência que amplifica de acordo com o gene de interesse para que haja uma relação mais acurada e a geração de um índice de número de cópias que mais se aproxima da realidade.

Tabela 2: Eficiência e Ct médio para cada par de *primers* desenhados para os genes controle das variedades SP803280 e RB835089

Genes	Eficiência (média de 3 repetições)	Ct (média de 3 repetições)
<i>gapdh</i> (SP803280)	2,10 a	33,47 d
<i>aprt</i> (SP803280)	2,02 a	18,13 a
<i>p4h</i> (SP803280)	2,03 a	20,89 b
<i>enol</i> (SP803280)	1,61 a	27,82 b
<i>cyc</i> (SP803280)	2,01 a	18,25 a
<i>prp</i> (SP803280)	1,98 a	21,05 c
<i>gapdh</i> (RB835089)	2,08 b	28,90 c
<i>aprt</i> (RB835089)	1,95 a	21,76 b
<i>p4h</i> (RB835089)	2,06 b	19,93 ab
<i>enol</i> (RB835089)	2,06 b	28,33 c
<i>cyc</i> (RB835089)	2,06 b	21,09 a
<i>prp</i> (RB835089)	1,97 a	21,43 b

* Letras demonstram a diferença estatística a 5% de significância pelo teste de Tukey.

Utilizando a fórmula proposta por XUE et al. (2014), pode-se chegar a um número aproximado da quantidade de cópias por genoma de cada gene testado, assim como pode ser observado na tabela 3. Para o cálculo, foram utilizados os Cts mostrados na tabela 2 e a fórmula apresentada no item 4.2.3, lembrando que tanto a variedade SP803280 quanto a RB835089 são heptaplóides.

Tabela 3: Número de cópias dos genes de referencia das variedades SP803280 e RB835089 segundo XUE et al. (2014)

Genes	Cópias
<i>gapdh</i> (SP803280)	7,25 c
<i>aprt</i> (SP803280)	3,93 a
<i>p4h</i> (SP803280)	4,53 b
<i>enol</i> (SP803280)	6,03 c
<i>cyc</i> (SP803280)	3,96 a
<i>prp</i> (SP803280)	4,56 b
<i>gapdh</i> (RB835089)	6,26 c
<i>aprt</i> (RB835089)	4,72 b
<i>p4h</i> (RB835089)	4,32 a
<i>enol</i> (RB835089)	6,14 c
<i>cyc</i> (RB835089)	4,57 ab
<i>prp</i> (RB835089)	4,64 b

* Letras demonstram a diferença estatística a 5% de significância pelo teste de Tukey.

** Teste aplicado para cada variedade separadamente

Pode-se observar uma nítida diferença na quantidade de genes presentes em cada variedade que podem ser enquadrados em 3 grupos distintos, os de maior, os intermediários e os de menor número de cópias no genoma. No entanto existe uma diferença em quais genes pertencem à cada um dos agrupamentos.

Para a SP803280, *gapdh* e *enol* formam o grupo com quantidade maior de genes, (acima de 6) sendo que *p4h* e *prp* se enquadram nos intermediários (aproximadamente 5) e *aprt* e *cyc* configuram o grupo com menor número de genes (menor que 4). Já para a variedade RB835089, os mesmos genes compõe o primeiro grupo, porém dentro dos intermediários se encontram *aprt* e *prp* não diferindo estatisticamente de *cyc* que também se enquadra no grupo de menor número juntamente com *p4h*.

Os processos de cruzamento que geraram as variedades estudadas explica o fato da existência da divergência no conteúdo de DNA observado e a diferença na quantidade dos genes observada nos experimentos. Isto, mostra que para cada variedade de interesse há a necessidade de realização de experimentos com o intuito de buscar os melhores padrões para cada objetivo de estudo.

4.3.3 Quantificação dos genes *xth* inseridos no genoma de cana-de-açúcar da variedade SP803280

Anteriormente ao procedimento de PCR em tempo real, 25 ng de DNA das amostras de plantas transgênicas, foram submetidas à nova PCR para nova confirmação da inserção do gene. Na figura 4, visualizamos o resultado desta, com a presença de bandas no tamanho esperado para todas as amostras testadas.

Figura 4: Gel de agarose 1% com o resultado da PCR convencional realizada com os DNAs de plantas transgênicas para o gene *xth* da variedade SP803280. C- controle negativo; C+ controle positivo (plasmídeo); WT - planta não transgênica (controle); XP4, A4P3, A7P2, P10, A13P3, A14P5, A15P1, P21, P26, XP30, P31, A46P3, P82, P84 - Plantas transgênicas para o gene *xth*

Para a verificação e validação dos *primers* específicos para PCR em tempo real, foi realizada uma PCR convencional com 25 ng de DNA de todas as amostras, na figura 5 pode-se observar a presença de bandas específicas para o gene *xth* no tamanho de 102 pb como esperado.

Figura 5: Gel de agarose 1% com o resultado da PCR convencional realizada com os *primers* para qRT-PCR específicos para o gene *xth* dos DNAs de plantas transgênicas da variedade SP803280. C- controle negativo; C+ controle positivo (plasmídeo); WT - planta não transgênica (controle); XP4, A4P3, A7P2, P10, A13P3, A14P5, A15P1, P21, P26, XP30, P31, A46P3, P82, P84 - Plantas transgênicas para o gene *xth*

As curvas de dissociação para os *primers* dos genes *xth*, *Atddm1* e *neo* que serão utilizados para o rastreamento do número de cópias inseridas estão representadas na figura 6. Como observa-se, não houveram pareamentos inespecíficos e os cálculos para a quantificação do número de cópias inseridas, seguiram os procedimentos descritos no item 4.2.3

Figura 6: Curvas de dissociação para os genes *xth* (A), *AtDdm1* (B) e *neo* (C).

Para a quantificação realizada segundo CASU; SELIVANOVA; PERROUX (2012), foram utilizados os dois genes de quantidade intermediária de número de cópias, *p4h* e *prr*, estes foram escolhidos por atender as premissas de terem Cts próximos entre 20 e 25 ciclos e estarem em proximidade ao Ct do gene de interesse, além de apresentarem apenas 1 pico na curva de dissociação.

De maneira geral, houve uma divergência na quantidade absoluta de cópias para o gene *xth* quando comparado aos dois genes estudados, pois quando se utiliza o gene *prr*, o índice de número de cópias é maior que o *p4h*. Este resultado que pode ser atribuído ao fato de o Ct do gene *prr* ser maior, levando a uma superestimativa da quantidade de genes, já que as eficiências para os dois genes controles não são estatisticamente diferentes (tabela 2).

Porém, excluindo-se as divergências na quantidade bruta do número de cópias, de maneira geral, houve uma conformidade nos grupos que podem ser gerados através das análises dos dados apresentados na tabela 4. Tem-se para os dois genes que o evento XP30, não apresentou diferença significativa com a amostra da planta controle apesar de ter demonstrado quantidade de cópias

diferentes de 0, assim, pode-se supor que esta amostra possui inserção de poucas ou apenas uma cópia no genoma. As amostras dos eventos XA4P3, XA7P2, XP21, XP26, XP31, XA46P3, XP82, XP4 e A13P3 apresentam números de cópias menores que 70 segundo os dois genes e podem ser enquadradas em um segundo grupo. O restante das amostras pode ser encaixado em outro grupo em que as cópias variam entre 71 e 95, segundo o gene *p4h*, já considerando o gene *prp*, a única amostra que formaria um novo grupo seria a XP84 que apresenta 165 como número de cópias estimado.

Tabela 4: Número de cópias do gene *xth* inserido no genoma da variedade SP803280 de acordo com os genes utilizados como referencia segundo método proposto por Casu; Selivanova; Perroux (2012).

Amostra	GCI Ref. <i>prp</i>	GCI Ref. <i>p4h</i>
WT	0,0 a	0,0 a
XP4	50,97 fgh	39,43 g
XA4P3	39,78 cd	27,11 c
XA7P2	23,68 b	17,55 b
XP10	60,95 h	48,35 h
XA13P3	58,75 gh	32,29 de
XA14P5	91,91 i	59,92 i
XA15P1	59,37 gh	46,73 h
XP21	29,72 b	15,24 b
XP26	43,63 def	34,77 ef
XP30	2,81 a	1,70 a
XP31	50,13 efg	36,14 fg
XA46P3	40,54 cde	30,80 d
XP82	31,84 bc	24,58 c
XP84	165,40 j	70,35 j

* Letras minúsculas demonstram a diferença significativa a 5% de significância pelo teste de T de Student entre as amostras dentro das colunas.

Considerando o método de cálculo descrito por XUE et al. (2014), houve bastante discrepância em relação as quantidades de genes calculada pelo primeiro método apresentado, sendo que este de maneira geral apresentou valores maiores. Porém, também pode-se formar 3 grupos estatisticamente distintos ao se analisar os resultados (tabela 5), o primeiro formado pela planta XP30 com número de cópias menor que 1. O segundo em que se enquadram, XP4, XA4P3,

XA7P2, XP10, XA13P3, XA15P1, XP21, XP26, XP31, XA46P3, XP82 E XP84, em que as cópias variam de 1 a 100 e um terceiro com cópia acima de 100 formado pela planta XP84.

Na comparação dos dois métodos analisados por este trabalho, pode-se propor a junção destes para a obtenção de um resultado mais confiável. Pois, com o índice de número de cópias proposto por Casu; Selivanova; Perroux, (2012), é possível se chegar ao número comparativo de cópias no genoma inteiro, comparado ao gene de referência. Já o método proposto por Xue et al (2014), detecta o número de cópias de genes inseridos por genoma. Ou seja, aliando-se as duas análises de maneira que o resultado para genes endógenos de Xue sirva como parâmetro na quantificação proposta por Casu, e levando-se em conta que a relação existente entre os dois métodos propostos é inversa, pode-se fazer o comparativo apenas dividindo-se o total gerado a utilização do comparativo proposto por Casu, pela quantidade de genes de referência endógenos calculados pela fórmula de Xue, chegando-se assim a um resultado que pode ser considerado mais confiável. Na figura 7 pode-se observar o comparativo dos 2 métodos estudados e com a relação existente entre eles.

Após a análise comparativa, têm-se que estatisticamente os valores apresentados pelo método de Casu não diferem entre si (letras maiúsculas da tabela) para a maioria das amostras analisadas, porém são menores em relação ao proposto por Xue, de acordo com o teste T à 5% de significância.

Tabela 5: Número de cópias do gene *xth* inserido no genoma da variedade SP803280 de acordo com os métodos propostos por Casu; Selivanova; Perroux (2012) e Xue et al (2014).

Amostra	GCI Ref. <i>PRR</i>	GCI Ref. <i>P4H</i>	Segundo Xue
WT	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A
XP4	11,18 fgh B	8,70 g A	8,25 ab A
XA4P3	8,72 cd A	5,98 c A	25,50 abc B
XA7P2	5,19 b A	3,87 b A	12,98 ab B
XP10	13,37 h B	10,67 h A	85,74 ef C
XA13P3	12,88 gh B	7,12 de A	113,55 f C
XA15P1	13,02 gh A	10,31 h A	67,35 de B
XP21	6,51 b A	3,36 b A	52,43 cd B
XP26	9,57 def B	7,68 ef A	28,50 bc C

XP30	0,61 a C	0,37 a B	0,006 a A
XP31	10,99 efg A	7,98 fg A	25,15 abc B
XA46P3	8,89 cde B	6,8 d A	30,29 bc C
XP82	6,98 bc A	5,42 c A	18,24 ab B
XP84	36,27 j B	15,53 j A	90,01 ef C

* Letras minúsculas demonstram a diferença significativa a 5% de significância pelo teste de T de Student.entre as amostras dentro das colunas.

** Letras maiúsculas demonstram a diferença significativa a 5% de significância pelo teste de T de Student.entre as amostras dentro das linhas.

Figura 7: Gráfico de comparação do número de cópias do gene *xth* inserido no genoma da variedade SP803280 de acordo com os métodos propostos por Casu; Selivanova; Perroux (2012) com os genes *p4h* e *prr* como referencia e Xue et al (2014).

4.3.3 Quantificação dos genes *AtDdm1* inseridos no genoma de cana-de-açúcar da variedade SP803280

Antes do procedimento de q-RT-PCR, 25 ng de DNA das amostras de plantas transgênicas, foram submetidas a nova PCR para nova confirmação da

inserção do gene com os *primers* específicos e outra com os sintetizados para PCR em tempo real. Na figura 8 pode-se observar a presença de bandas específicas para o gene *AtDdm1* nos tamanhos esperados.

Figura 8: Géis de agarose 1% com o resultado das PCRs para o gene *AtDdm1* com *primers* específicos para qRT-PCR (A) e *primers* para PCR convencional (B). 1Kb -Ladder 1Kb plus; WT - planta controle; D3 e D6- plantas transgênicas para o gene *AtDdm1*. C- Controle negativo; C+ Controle positivo.

Os resultados apresentados para o gene *AtDdm1* inseridos no genoma da variedade SP803280, também divergiram de acordo com o método utilizado. Porém as diferenças encontradas dentro do procedimento proposto por Casu não foram significativamente diferentes para a planta D6, ao contrario da planta D3.

Quando comparados os dois métodos têm-se divergências, sendo que de modo geral o proposto por Xue apresenta valores maiores. A tabela 6 e a figura 9 demonstram a comparação dos valores obtidos nas análises. Observa-se que, há uma tendência na estimativa do número de cópias quando comparados os três métodos, sendo que a planta D3 possui menor quantidade de cópias (aproximadamente 9), e a D6 possui maior quantidade de genes inseridos, cerca de 11 considerando o método de Casu e 24 com o de Xue.

Tabela 6: Número de cópias do gene *AtDdm1* inserido no genoma da variedade SP803280 de acordo com os métodos propostos por Casu; Selivanova; Perroux (2012) e Xue et al (2014).

Amostra	Segundo Casu Ref. <i>PRR</i>	Segundo Casu Ref. <i>P4H</i>	Segundo Xue
WT	0 a A	0 a A	0 a A
D3	9,00 b A	7,68 b B	9,42 b A
D6	11,58 c A	11,33 c A	24,18 c B

* Letras minúsculas demonstram a diferença significativa a 5% de significância pelo teste de T de Student.entre as amostras dentro das colunas.

** Letras maiúsculas demonstram a diferença significativa a 5% de significância pelo teste de T de Student.entre as amostras dentro das linhas.

Figura 9: Gráfico de comparação do número de cópias do gene *AtDdm1* inserido no genoma da variedade SP803280 de acordo com os métodos propostos por Casu; Selivanova; Perroux (2012) com os genes *p4h* e *prp* como referencia e Xue et al (2014).

4.3.4 Quantificação dos genes *neo* inseridos no genoma de cana-de-açúcar da variedade RB835089

De acordo com as PCRs para reconfirmação da presença do gene *neo*, tanto os *primers* para qRT-PCR quanto com os para PCR convencional apresentaram bandas nos locais esperados como pode ser observado na figura 10.

Figura 10: Géis de agarose 1% com o resultado das PCRs para o gene *neo* com *primers* específicos para qRT-PCR (A) e *primers* para PCR convencional (B). 1Kb - Ladder 1 Kb plus; C- controle negativo; C+ controle positivo; WT- planta controle (selvagem); 16, 19 21 - plantas transgênicas para o gene *neo*

Nos cálculos realizados para a variedade RB835089, os genes *APRT* e *P4H* foram utilizados como controle, por se tratar de genes com números de cópias intermediárias e apresentarem Cts parecidos com o que o gene de interesse apresentou, como recomendado por CASU; SELIVANOVA; PERROUX, (2012).

Na quantidade bruta de cópias mais uma vez pode-se observar a divergência de acordo com o gene utilizado como referência e também em relação ao método. Porém, a tendência de plantas com maiores (planta 19) e menores (planta 16) números de cópias se manteve o mesmo para todos os cálculos realizados. Somente a planta 21 apresentou congruência de valores de acordo com o teste de T-Student a 5% de significância, pois não apresentou diferença significativa dentre os valores encontrados pelos métodos como pode ser observado na tabela 7 e figura 11.

Tabela 7: Número de cópias do gene *neo* inserido no genoma da variedade SP803280 de acordo com os métodos propostos por Casu; Selivanova; Perroux (2012) e Xue et al (2014)..

Amostra	Segundo Casu	Segundo Casu	Segundo Xue
	<i>aprt</i>	<i>prr</i>	
WT	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A
16	0,89 b A	1,96 b B	3,36 b C
19	9,33 d B	8,17 c C	3,42 c A
21	2,60 c A	2,45 b A	3,44 c A

* Letras minúsculas demonstram a diferença significativa a 5% de significância pelo teste de T de Student.entre as amostras dentro das colunas.

** Letras maiúsculas demonstram a diferença significativa a 5% de significância pelo teste de T de Student.entre as amostras dentro das linhas.

Figura 11: Gráfico de comparação do número de cópias do gene *neo* inserido no genoma da variedade SP803280 de acordo com os métodos propostos por Casu; Selivanova; Perroux (2012) com os genes *p4h* e *prr* como referencia e Xue et al (2014).

Considerando todos os genes analisados pelos cálculos propostos por Casu *et al* (2012) e por Xue *et al* (2014), não houve congruência entre estes no que diz respeito ao número absoluto de cópias inseridas. Porém, é possível estabelecer uma relação de concordância entre a quantificação das cópias, sendo que grupos estabelecidos de maiores e menores números de cópias apresentam a mesma tendência nos método apresentados. De maneira geral, os resultados conseguidos pelo segundo método apresentado foram maiores em comparação com o primeiro,

fato que pode ser atribuído a uma possível superestimação ou em uma análise mais detalhada, pode ser considerado mais sensível às variações relacionadas aos Cts das amostras analisadas.

Para a transformação genética de cana-de-açúcar, o bombardeamento de partículas é o método mais utilizado e produz uma variação na quantidade de genes inseridos que é compatível à variação encontrada nesse trabalho. Este evento ocorre pelo fato de que não há como prever a quantidade ou localização dos genes, pois a técnica leva à inserção de maiores ou menores números de cópias aleatórias no genoma.

Diversos trabalhos desde o começo da transformação genética de cana-de-açúcar nos anos de 1990 tem comprovado esta aleatoriedade, como os realizados com a inserção do gene *neo* que encontrou variação pequena de 1 a 3 cópias ou pelo mesmo grupo com a inserção do gene *uidA* variando entre 1 a 14 cópias (BOWER; BIRCH, 1992; BOWER et al., 1996). Mais recentemente, ainda em cana, pode-se comprovar por Southern Blot a inserção de 1 a 5 cópias dos genes *bar* e *neo* (FALCO; TULMANN NETO; ULIAN, 2000), porém os autores afirmam que não há a quantificação precisa, pois as bandas formadas pelo método não foram apresentaram nitidez suficiente para uma análise confiável, sendo que os resultados apresentados se tratam de uma estimativa. Outras variações que pode ser utilizada como comparativo dentro da espécie são as de 3 a 158 cópias do gene *neo* encontrada por Casu et al (2012), de 1 a múltiplas cópias do mesmo gene que foram bombardeadas com a utilização de diversas estratégias (XIONG et al., 2013; WU et al., 2015). Ainda em trabalho realizado com cassete mínimo que contém o gene *neo* buscando uma melhoria da geração de transgênicos de variedades de cana energia promissoras mas até então não responsivas aos procedimentos de transgenia, encontrou-se de 1 a mais de 10 cópias inseridas.

Pelos métodos tradicionais a quantificação de transgenes no genoma de cana-de-açúcar é difícil, onerosa e muitas vezes ineficiente, porém métodos de qRT-PCR vem sendo utilizados de forma eficiente como alternativa para uma rápida detecção e estimativa destes. Porém ainda precisam de padrões para assegurar maior confiabilidade dos resultados

4.4 Conclusões

O processo de transformação genética por bombardeamento de partículas não gerou alterações significativas na ploidia e quantidade de DNA de acordo com dados da citometria de fluxo.

As variedades SP803280 e RB835089 são heptaplóides e possuem genoma com tamanhos médios de 7064 Mb, e 6833Mb, respectivamente.

Os genes *p4h* e *prp* são recomendados para referência na quantificação de número de cópias da variedade SP803280.

Para a variedade RB835089, os genes *aprt* e *prp* demonstram características melhores para a quantificação relativa do número de cópias inseridas.

O número de cópias inseridas dos genes *xth*, *AtDdm1* e *neo* pode ser calculado de maneira relativa e absoluta utilizando cálculos baseados em dados de qRT-PCR.

Referências

- BOWER, R.; BIRCH, R.G. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. **Plant Journal**, Malden, 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**, Lleida, v. 2, n. 3, p. 239–249, 1996.
- CASU, R.E.; SELIVANOVA, A.; PERROUX, J.M. High-throughput assessment of transgene copy number in sugarcane using real-time quantitative PCR. **Plant Cell Reports**, Berlim, v. 31, n. 1, p. 167–177, 2012.
- DE SANTIS, C.; SMITH-KEUNE, C.; JERRY, D. R. Normalizing RT-qPCR Data: Are We Getting the Right Answers? An Appraisal of Normalization Approaches and Internal Reference Genes from a Case Study in the Finfish *Lates calcarifer*. **Marine Biotechnology**, New Castle, v. 13, n. 2, p. 170–180, 2011.
- 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**, v. 19, n. 12, p. 1188–1194, 2000.
- LING, H.; WU, Q.; GUO, J.; XU, L.; QUE, Y. Comprehensive selection of reference genes for gene expression normalization in sugarcane by real time quantitative RT-PCR. **Plos One**, Alabama, v. 9, n. 5, p. 469-479, 2014.
- SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, La Jolla, v. 98, p. 503–517, 1975. 95
- WAN, H.; ZHAO, Z.; QIAN, C.; SUI, Y.; MALIK, A.A.; CHEN, J. Selection of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time polymerase chain reaction in cucumber. **Analytical Biochemistry**, Bethesda, v. 399, n. 2, p. 257–261, 2010.
- WU, H.; AWAN, F. S.; VILARINHO, A.; ZENG, Q.; CAFFALL, K.; ALTPETER, F. Transgene integration complexity and expression stability following biolistic or *Agrobacterium* -mediated transformation of sugarcane. **In Vitro Cellulae and Developmental Biology—Plant**, Columbia, p. 603–611, 2015.
- XIONG, Y.; JUNG, J.; ZENG, Q.; GALLO, M.; ALTPETER, F. Comparison of procedures for DNA coating of micro-carriers in the transient and stable biolistic transformation of sugarcane. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 112, n. 1, p. 95–99, 2013.
- XUE, B.; GUO, J.; QUE, Y.; FU, Z.; WU, L.; XU, L. Selection of suitable endogenous reference genes for relative copy number detection in sugarcane **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 15 p. 8846–8862, 2014.
- ZHANG, T.; MARUHNICH, S.A.; FOLTA, K.M. Green light induces shade avoidance symptoms. **Plant Physiology**, Palo Alto, v. 157, n. 3, p. 1528–1536, 2011.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da produção de cana-de-açúcar estar em crescimento e ser uma das maiores dentre os produtos do agronegócio brasileiro, ainda há a necessidade de incremento de produtividade, pois a demanda por energia e alimento são cada vez maiores. Dentro disso, a cultura de tecidos aliada à transformação genética de plantas se destacam como estratégias promissoras, abrindo a possibilidade da geração de cultivares mais produtivos e resistentes à estresses bióticos e abióticos. Este fato, possivelmente, pode levar ao incremento de produção sem a necessidade de maiores agressões ao meio ambiente devido a diminuição na utilização de pesticidas e de água.

A utilização da cultura de tecidos em cana-de-açúcar, apesar de bem estabelecida desde a década de 90, precisa ser adequada às variedades estudadas pois cada qual se comporta de maneira distinta frente ao cultivo *in vitro*. Fatores como a composição do meio de cultura, condições de luminosidade, desinfestação e inoculação de explantes variam dentre espécies e variedades.

Este trabalho como um todo, trouxe inovações para a cultura de tecidos e análise de transgênicos. Em um primeiro momento, a melhora na qualidade da luz utilizada nos processos de regeneração e crescimento de plantas a partir de calos embriogênicos e discos foliares, geram um protocolo mais eficiente, proporcionando além de economia de tempo uma sustentabilidade maior para o processo.

Especificamente para cana-de-açúcar da variedade SP803280, não há até o momento relatos na literatura acerca das condições de cultivo mediante à diferentes qualidades de luz na regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos e discos foliares. Geralmente a luz fluorescente branca com espectro de comprimentos de onda variando entre 400 e 680 nm é utilizada na maior parte das salas de crescimento. Contudo, nos últimos anos houve o surgimento da tecnologia de luzes LED que além de mais duráveis e energeticamente econômicas, emitem um espectro mais específico nos comprimentos de onda fotossinteticamente ativos da ordem de 400 e 700 nm, proporcionando uma melhor utilização da luz pelas plantas durante o cultivo *in vitro*. Sendo assim, um dos objetivos deste trabalho foi o estabelecimento da melhor qualidade de luz na regeneração de plantas através de discos foliares e calos embriogênicos de cana-de-açúcar frente a distintas iluminações, sendo estas a luz fluorescente branca, a LED e a junção das duas

qualidades. Observou-se após 90 dias da data de inoculação que para calos embriogênicos, o uso combinado das duas luzes levou a um incremento cerca de 21% e 35% na cobertura de plantas por calo e tamanho, respectivamente. Já para discos foliares, a combinação de luzes proporcionou a regeneração de 17,6% mais plantas por disco em comparação aos outros tratamentos, e a luz branca produziu plantas cerca de 20,28% maiores.

Os resultados apresentados levam a um incremento das condições de regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos e discos foliares no cultivo *in vitro* da variedade SP803280. Os materiais vegetais utilizados durante o experimento são os mesmos usados no procedimento de transformação genética de cana-de-açúcar e esta melhoria permite também a geração de plantas geneticamente modificadas de maneira mais eficaz.

A otimização dos protocolos de obtenção de transgênicos em cana-de-açúcar foi outro objetivo deste trabalho. A etapa de seleção de plantas com agente seletivo geneticina é específica de cada variedade e acontece pois a transformação genética com o gene *neo*, permite o crescimento de plantas que são resistentes a este antibiótico. A variedade SP803280 se mostrou mais resistente ao agente seletivo pois, nos primeiros experimentos de transformação genética realizados houve uma regeneração massiva de plantas não transgênicas mesmo na presença de 30 mgL⁻¹ do antibiótico, o que levou a elevados custos e gasto de tempo na seleção das plantas por PCR. Deste modo, procurando melhorar a seleção de plantas geneticamente modificadas, calos embriogênicos e plantas não transformadas foram expostos à diferentes concentrações de geneticina, variando entre 30 e 60 mgL⁻¹ em que para o preparo da solução estoque foi considerado ou não a quantidade de princípio ativo em cada miligrama do produto. Observou-se a sobrevivência das plântulas e calos após 60 dias, os resultados apresentados levam a conclusão de que é necessária a utilização de uma concentração entre 40 e 50 mgL⁻¹ de princípio ativo do antibiótico geneticina para seleção de plantas geneticamente transformadas da variedade SP803280 tanto em calos embriogênicos quanto na seleção posterior das plantas regeneradas. Recomenda-se que a concentração de 45 mgL⁻¹ seja adotada em futuros experimentos de transformação genética utilizando esta variedade de cana-de-açúcar.

Alguns genes são promissores para a geração de transgênicos em cana-de-açúcar, dentre estes estão os genes que foram utilizados neste trabalho

que são relacionados na manutenção de estabilidade do DNA, pois a espécie apresenta um genoma grande e com elevada presença de elementos transponíveis, e em processos metabólicos que melhoram a capacidade de produção de polissacarídeos e biomassa, procurando gerar plantas com maior produtividade possível.

Neste sentido o gene *AtDdm1*, bem caracterizado como atuante na manutenção da metilação do DNA, levaria ao aumento da estabilidade do genoma pela inativação de elementos transponíveis (HIGO et al., 2012). Estes são presentes em grande quantidade no genoma da cana-de-açúcar e levam a uma maior instabilidade e complexidade (ARAUJO, DE et al., 2005). Em trabalhos anteriores a inserção deste gene na variedade RB835486 levou a uma menor expressão, analisada por PCR quantitativo, de elementos de transposição (PICELLI, 2010).

Outro gene em que a superexpressão no genoma da cana seria promissora, é o *xth* que codifica para proteínas envolvidas no remodelamento de parede celular da família das xiloglucanos endotransglicosilases/hidroxilases, que induziria o aumento da formação de xiloglucanos na parede celular (MIEDES et al., 2013). Este aumento dos polissacarídeos poderia gerar um incremento na geração de etanol de segunda geração o que proporcionaria uma menor competição entre a geração de biocombustíveis e alimento.

Neste trabalho a transformação genética com os genes citados foram realizadas por meio da utilização do procedimento de bombardeamento de partículas este gerou 2 eventos para o gene *AtDdm1* e 14 para o *xth*. Cada bombardeamento obteve porcentagens de sucesso diferentes, a maioria das tentativas não resultou em nenhum resultado positivo provavelmente devido a problemas de protocolo na aquisição de material vegetal de qualidade e seleção das plantas geneticamente transformadas. A transformação genética de cana-de-açúcar por biobalística é de difícil execução, a inserção de genes é aleatória e, a estabilidade destes genes também é instável principalmente devido ao fato da espécie apresentar uma grande quantidade de transposons ativos.

Após os procedimentos e averiguação da presença do gene de interesse em plantas transgênicas por PCR, a próxima etapa diz respeito à análise do número de cópias inseridas pelo processo de transformação. A técnica mais utilizada para este fim é o Southern Blot que consiste na extração do DNA da planta transgênica seguido de digestão com enzimas de restrição e hibridização com uma

sonda específica para o gene inserido. Porém, no caso de cana-de-açúcar este procedimento se mostra por muitas vezes ineficaz não produzindo resultados satisfatórios gerando resultados negativos ou hibridizações inespecíficas. Assim, o desenvolvimento de métodos que sejam mais rápidos e confiáveis para a averiguação do número de cópias inseridas é necessário. A técnica de PCR em tempo real é uma alternativa que têm sido utilizada para este fim em diversas espécies, no caso de cana-de-açúcar há dois métodos descritos: o primeiro gera um índice de número de cópias (GCI), o qual se baseia na relação entre um gene de referência e o gene inserido (CASU; SELIVANOVA; PERROUX, 2012). O segundo foi utilizado para a verificação do número de cópias de genes endógenos e é uma quantificação absoluta baseada em relações de tamanho e peso do genoma (XUE et al., 2014), foi proposta a utilização deste também na verificação do número de cópias inseridas de genes de interesse. Ambas as maneiras são baseadas em dados de eficiência e ct produzidos pelo experimento de PCR em tempo real.

Anteriormente a quantificação do número de cópias é necessária uma etapa de normalização em que é necessário a descoberta de genes controle específicos para serem utilizados como referência, estes precisam ter uma amplificação próxima com a do gene alvo, geralmente entre 25 e 30 ciclos e possuir número de cópia único ou baixo no genoma (ISKANDAR et al., 2004; CASU; SELIVANOVA; PERROUX, 2012). Neste experimento, utilizou-se as variedades SP803280 e RB835089 não transgênicas, e observou-se que para a variedade SP803280 os genes *p4h* e *pr* são os mais promissores para figurar como controle para a verificação do número de cópias inseridas enquanto que para RB835089 *aprt* e *p4h* são os mais recomendados.

Utilizando dos dados obtidos houve a determinação do número de cópias inseridas analisadas pelas duas metodologias citadas nos eventos transgênicos para os genes *xth* e *AtDdm1* da variedade SP803280 e *neo* da variedade RB835089. A quantificação foi realizada de maneira eficiente e rápida pelos dois métodos testados. Não houve uma concordância no número absoluto de cópias inseridas, porém é possível realizar uma relação entre os métodos testados dividindo as plantas transgênicas em grupos, de baixo, intermediário e alto número de cópias. Os resultados deste experimento apresentam uma tendência a ser seguida nos próximos anos, porém ainda são necessários ajustes e validações para sua utilização de maneira confiável.

Referências

ARAUJO, P.G. DE; ROSSI, M.; JESUS, E.M. DE; SACCARO, N.L.; KAJIHARA, D.; MASSA, R.; FELIX, J.M. DE; DRUMMOND, R.D.; FALCO, M.C.; CHABREGAS, S.M.; ULIAN, E.C.; MENOSSI, M.; SLUYS, M.A.V. Transcriptionally active transposable elements in recent hybrid sugarcane. **Plant Journal**, Malden, v. 44, n. 5, p. 707–717, 2005.

CASU, R.E.; SELIVANOVA, A.; PERROUX, J.M. High-throughput assessment of transgene copy number in sugarcane using real-time quantitative PCR. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 31, n. 1, p. 167–177, 2012.

HIGO, H.; TAHIR, M.; TAKASHIMA, K.; MIURA, A.; WATANABE, K.; TAGIRI, A.; UGAKI, M.; ISHIKAWA, R.; EIGUCHI, M.; KURATA, N.; SASAKI, T.; RICHARDS, E.; TAKANO, M.; KISHIMOTO, N.; KAKUTANI, T.; HABU, Y. DDM1 (Decrease in DNA Methylation) genes in rice (*Oryza sativa*). **Molecular Genetics and Genomics**, Kemivägen, v. 287, n. 10, p. 785–792, 2012.

MIEDES, E.; SUSLOV, D.; VANDENBUSSCHE, F.; KENOBI, K.; IVAKOV, A.; STRAETEN, D. VAN DER; LORENCES, E. P.; MELLEROWICZ, E.J.; VERBELEN, J.P.; VISSENBERG, K. Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) overexpression affects growth and cell wall mechanics in etiolated *Arabidopsis* hypocotyls. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 8, p. 2481–2497, 2013.

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 gene expression in sugarcane. **Plant Molecular Biology Reporter**, Dordrecht, v. 22, p. 325–337, Dec. 2004.

PICELLI, E.C.M. **Cultura de tecidos e transformação genética com o gene Ddm1 no estudo do silenciamento de elementos de transposição**. 2010. 140 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

XUE, B.; GUO, J.; QUE, Y.; FU, Z.; WU, L.; XU, L. Selection of suitable endogenous reference genes for relative copy number detection in sugarcane **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 15, p. 8846–8862, 2014.