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

Transformação genética de cana-de-açúcar por biolística e *Agrobacterium tumefaciens* visando estudar o mecanismo de morte celular programada

Danila Montewka Melotto-Passarim

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

**Piracicaba
2009**

Danila Montewka Melotto-Passarin
Engenheira Agrônoma

Transformação genética de cana-de-açúcar por biolística e *Agrobacterium tumefaciens*
visando estudar o mecanismo de morte celular programada

Orientadora:
Profa. Dra. HELAINE CARRER

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

Piracicaba
2009

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

Melotto-Passarin, Danila Montewka

Transformação genética de cana-de-açúcar por biolística e *Agrobacterium tumefaciens* visando estudar o mecanismo de morte celular programada / Danila Montewka Melotto-Passarin. - - Piracicaba, 2009.

147 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2009.
Bibliografia.

1. Bactérias gram-negativas 2. Biolística 3. Biologia molecular vegetal 4. Cana-de-açúcar
5. Genética molecular vegetal 6. Variação genética em plantas I. Título

CDD 633.61
M528t

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

Ao meu filho Matheus que é o mais belo tesouro da minha vida, minha maior conquista!

Ao meu marido Rogério

Pelo amor, cumplicidade, constante incentivo e apoio!

À minha mãe Helena

Às minhas irmãs, Carolina e Ludimila

Aos meus cunhados, Fernando Rocha e Fernando Limonge

Por todo apoio, amor e compreensão!

Ao meu pai Elias (sempre presente)

Pelas lembranças maravilhosas e
por ser o grande exemplo em minha vida!

Estes são os presentes de Deus em minha vida e
que partilham comigo desta vitória alcançada...

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar sempre presente em minha vida me guiando e iluminando, possibilitando-me mais uma vitória.

À Profa. Dra. Helaine Carrer pela orientação, credibilidade, amizade, apoio, e principalmente pela compreensão. Muito obrigada Helaine por todas as oportunidades durante 7 anos de convívio.

Ao Dr. Fábio T. S. Nogueira pelas sugestões, conselhos, disponibilização de material para o desenvolvimento de alguns experimentos, e principalmente pela convivência e amizade.

Ao Prof. Dr. Daniel Scherer de Moura pela inestimável ajuda e pronta disponibilização de seu laboratório para realização de alguns experimentos, e principalmente pela amizade.

À MSc. Valentina de Fátima de Martin pelo apoio técnico para o desenvolvimento da minha tese, pelas sugestões e críticas, e principalmente pelo convívio e amizade.

Ao Dr. Ênio Tiago de Oliveira pelo apoio técnico, sugestões e críticas, e principalmente pelo convívio.

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

A todos os integrantes do Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC), do Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ-USP. Aos professores Otto Jesu Crocomo, Murilo de Melo e Luiz Antonio Gallo, pela amizade e orientação em inúmeros momentos. Ao funcionário Antonio F. C. do Amaral agradeço pela amizade e pelo auxílio nas etapas deste trabalho.

Às grandes amigas Joice e Keini, em especial, pela convivência, conselhos, amizade duradoura e paciência no dia-a-dia do laboratório.

À grande amiga Simone pelo convívio, amizade e ajuda nos momentos necessários para o desenvolvimento de alguns experimentos.

Aos grandes amigos André, Evandro, Frederico pela amizade duradoura, conselhos e companheirismo.

Agradeço a todos os amigos do CEBTEC, Ana Carolina, Eduardo, George, Graça, Leno, Marcelo, Rafael pelo convívio em equipe, amizade e companheirismo, pelas sugestões, críticas e opiniões, favorecendo o desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

Agradeço, enfim, a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	09
ABSTRACT.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	13
LISTA DE TABELAS.....	23
LISTA DE ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES.....	25
1 INTRODUÇÃO.....	29
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	31
2.1 Cana-de-açúcar.....	31
2.2 Transformação genética.....	33
2.2.1 Transformação genética de cana-de-açúcar.....	36
2.3 Estresses Abiótico e Biótico.....	40
2.4 Morte Celular Programada.....	43
2.5 O gene <i>BI-1</i> de plantas.....	47
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	55
3.1 Material vegetal.....	55
3.1.1 Obtenção de calos.....	55
3.1.2 Teste de regeneração de plântulas da variedade RB835089 <i>in vitro</i>	57
3.2 Seleção do transgene para transformação genética nuclear de cana-de-açúcar.....	58
3.2.1 Análise <i>in silico</i> da proteína AtBI-1.....	58
3.2.2 Análise filogenética da proteína BI-1.....	58
3.3 Transformação genética de cana-de-açúcar via biolística.....	59
3.3.1 Construção dos vetores para expressão na planta.....	59
3.3.2 Sequenciamento do cDNA de <i>AtBI-1</i> clonado.....	62
3.3.3 Otimização dos parâmetros de bombardeamento.....	62
3.3.4 Co-transformação com vetor pH9.....	65
3.3.5 Seleção, regeneração e obtenção de plantas transgênicas.....	66
3.4 Transformação genética de cana-de-açúcar via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	67
3.4.1 Linhagem, plasmídeo e condições de cultura de <i>A. tumefaciens</i>	67
3.4.2 Inoculação e co-cultura.....	67

3.4.3 Seleção, regeneração e obtenção de plantas transgênicas.....	68
3.5 Caracterização molecular das plantas transgênicas.....	69
3.5.1 Extração de DNA total e análises de PCR.....	69
3.5.2 Extração de RNA total e síntese de cDNA para RT-PCR.....	70
3.5.3 Extração de proteínas e análise de expressão por <i>Western Blot</i>	71
3.5.4 Análise da integração do DNA pela técnica de <i>Southern Blot</i>	74
3.6 Bioensaio de plantas transgênicas com antibiótico tunicamicina.....	76
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	79
4.1 Obtenção de calos e regeneração de plântulas da variedade RB835089 <i>in vitro</i>	79
4.2 Seleção do transgene para transformação genética de cana-de-açúcar.....	81
4.2.1 Análise <i>in silico</i> da proteína AtBI-1.....	81
4.2.2 Análise filogenética da proteína BI-1.....	82
4.2.3 Construção dos vetores de transformação pDM8 e pDM9.....	85
4.2.4 Sequenciamento do cDNA de <i>AtBI-1</i> clonado.....	86
4.3 Transformação genética de cana-de-açúcar por Biolística e <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	87
4.3.1 Eficiência da transformação genética de cana-de-açúcar.....	91
4.4 Caracterização molecular das plantas transgênicas.....	95
4.4.1 Seleção das plantas transformadas por análises de PCR.....	95
4.4.2 Análise de expressão do cDNA <i>AtBI-1</i> nas plantas transgênicas.....	99
4.4.3 Análise de <i>Western Blotting</i> da proteína AtBI-1 nas plantas transgênicas.....	105
4.4.4 Análise da integração do DNA pela técnica de <i>Southern Blot</i>	109
4.5 Bioensaio de plantas transgênicas com antibiótico tunicamicina.....	115
4.5.1 Avaliação do crescimento do sistema radicular.....	116
4.5.2 Avaliação do conteúdo de clorofila total.....	121
5 CONCLUSÕES.....	127
REFERÊNCIAS.....	129

RESUMO

Transformação genética de cana-de-açúcar por biolística e *Agrobacterium tumefaciens* visando estudar o mecanismo de morte celular programada

A cana-de-açúcar é uma das principais culturas agrícolas plantadas no Brasil e apresenta significativa importância sócio-econômica e agroindustrial ao país. O cenário mundial encontra-se bastante favorável no que concerne à comercialização de seus dois principais produtos derivados, o açúcar e o álcool, impulsionando o desenvolvimento do setor sucroalcooleiro nacional. Neste sentido, o melhoramento genético da cana-de-açúcar aparece como base fundamental para o desenvolvimento de novas variedades para a manutenção e incremento dos agronegócios da agroindústria sucroalcooleira. Técnicas de engenharia genética, como a transformação genética nuclear, estão trazendo excelentes resultados no melhoramento genético da cultura, permitindo diminuir o custo e o tempo de obtenção de novas variedades. Baseando-se na importância em se obter variedades tolerantes a diferentes estresses bióticos e abióticos que induzem perturbações metabólicas e ativam o processo de morte celular programada, o presente trabalho teve por objetivo transformar geneticamente a variedade de cana-de-açúcar RB835089 com o cDNA do gene *AtBI-1* isolado de *Arabidopsis thaliana*, visando suprimir a indução do mecanismo de morte celular sob condição de estresse. Para isto, calos embriogênicos foram utilizados como explante alvo, empregando-se dois métodos de transformação, a co-transformação por biolística, e o mediado por *Agrobacterium tumefaciens* no qual foram testadas duas técnicas: (a) inoculação direta dos calos em suspensão bacteriana; e (b) agrobiolística que é o bombardeamento dos calos com partículas de tungstênio seguido da inoculação em suspensão bacteriana. A proteína *AtBI-1* (*Bax inhibitor-1*) apresenta homólogos em outros organismos e está localizada na membrana do retículo endoplasmático. Ela apresenta funções citoprotetoras modulando o mecanismo de morte celular programada induzida por estresses bióticos e abióticos. Como resultados deste trabalho, diferentes taxas de eficiência da transformação genética foram obtidas pelo método mediado por *A. tumefaciens* nas duas técnicas testadas, sendo que suas taxas foram superiores às alcançadas pelo método de co-transformação por biolística. A expressão heteróloga do cDNA do gene *AtBI-1* em cana-de-açúcar atenuou a indução das vias de morte celular em presença do antibiótico tunicamicina, indutor do estresse no retículo endoplasmático, sendo comprovado pela maior tolerância ao estresse das plantas transgênicas quando comparadas com as plantas não transformadas que foram afetadas no crescimento do sistema radicular, conteúdo de clorofila total, apresentando sintomas típicos de morte celular programada como clorose foliar e morfologia irregular das raízes, com consequente morte do sistema radicular.

Palavras-chave: cana-de-açúcar; transformação genética; biolística; *Agrobacterium tumefaciens*; morte celular programada; gene *AtBI-1*; estresse abiótico; antibiótico tunicamicina.

ABSTRACT

Genetic transformation of sugarcane by biolistic and *Agrobacterium tumefaciens* to study the mechanism of programmed cell death

Sugarcane is one of the main crops planted in Brazil and presents significant socio-economic and agribusiness importance to the country. The world scene is quite favorable as regards the marketing of its two main products, sugar and alcohol, driving the development of the national sugar-alcohol sector. Therefore, the sugarcane genetic breeding appears as the fundamental base for developing new varieties for the maintenance and increase of agribusiness in the sugarcane agroindustry. Genetic engineering techniques, such as the nuclear genetic transformation, are providing excellent results in genetic breeding of this crop allowing reducing the cost and time to obtain new varieties. Based on the importance of obtaining varieties tolerant to different biotic and abiotic stresses that induce metabolic disturbances and activate the process of programmed cell death, this work aimed to transform sugarcane variety RB835089 with the cDNA of *AtBI-1* gene, isolated from *Arabidopsis thaliana*, to suppress the induction of the cell death mechanism under stress condition. For this, embryogenic calli were used as target explant, by using two methods of transformation, the cotransformation by biolistic, and mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in which two techniques were tested: (a) direct inoculation of calli in bacterial suspension; (b) agrobiolistic which is the bombardment of calli with tungsten particles followed by inoculation in bacterial suspension. The AtBI-1 protein (Bax inhibitor-1) presents homologs in other organisms and is located in the endoplasmic reticulum membranes. It has cytoprotective functions by modulating the mechanism of programmed cell death induced by biotic and abiotic stresses. As results of this work, different efficiency rates in genetic transformation were obtained in the method mediated by *A. tumefaciens* in the two techniques tested, and that their rates were higher than those achieved using the cotransformation by biolistic. The heterologous expression of cDNA of *AtBI-1* gene in sugarcane attenuated the induction of cell death pathways in the presence of tunicamycin antibiotic, an inducer of stress in the endoplasmic reticulum, being proven by the increased stress tolerance of transgenic plants compared with sugarcane wild type that were affected in the root growth, total chlorophyll content, showing typical symptoms of programmed cell death such as leaf chlorosis and irregular morphology of the roots, with subsequent death of the root system.

Keywords: sugarcane; genetic transformation; biolistic; *Agrobacterium tumefaciens*; programmed cell death; *AtBI-1* gene; abiotic stress; tunicamycin antibiotic.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - O destino da célula é determinado por uma variedade de fatores externo e interno (ou sua ausência). (Figura adaptada de WILLIAMS et al., 1992).....	44
Figura 2 - Inibidor Bax-1 (<i>Bax inhibitor-1</i> : BI-1) é uma proteína reguladora negativa da morte celular em plantas, animais e leveduras. (Fonte: <i>homepage</i> http://cabm.rutgers.edu/research.html , modificado).....	47
Figura 3 - Sequência para obtenção de calos embriogênicos <i>in vitro</i> . A: Ponteiros de cana vindos do campo. B: Segmento da parte apical (10 cm) que contém o meristema apical caulinar protegido por folhas jovens enroladas (Palmito). C: Esterilização superficial com etanol absoluto, e posteriormente com solução de hipoclorito de sódio 30% sob agitação. D: Cortes transversais de aproximadamente 2 mm de espessura. E: Disco foliar em meio MS3AC para indução de calos no escuro. F: Calos embriogênicos em meio MS3AC que são selecionados e transferidos para meio fresco em cada subcultivo. G e H: Regeneração de plântulas em meio MSAC (fotoperíodo 16 horas).....	56
Figura 4 - Calos da variedade RB835089. (A) Calos com aspecto embriogênico; (B) Calos com aspecto não morfogênico.....	57
Figura 5 - Esquema representativo do plasmídeo pHA9 que contém o cassete de expressão do gene <i>neo</i> que codifica para neomicina fosfotransferase (NPTII) sob o controle do promotor da ubiquitina do milho (<i>Ubi-1</i>) e o terminador da nopalina sintetase <i>T-Nos</i> . As setas indicam a posição dos <i>primers nptII</i> (<i>Forward</i>) e <i>nptII</i> (<i>Reverse</i>). Sítios de restrição: B, <i>Bam</i> HI; Bg, <i>Bgl</i> III; E, <i>Eco</i> RI; H, <i>Hind</i> III; N, <i>Nae</i> I; P, <i>Pst</i> I; Sa, <i>Sal</i> I; Sp, <i>Sph</i> I; T, <i>Tth</i> I; X, <i>Xba</i> I.....	60
Figura 6 - Esquema representativo do vetor pDM8 com 4585 pb que contém o cassete de expressão do cDNA do gene <i>AtBI-1</i> fusionado ao <i>V5-His₆ tagged</i> sob o controle do promotor <i>CaMV35S</i> e o terminador da nopalina sintase <i>T-Nos</i> . As setas indicam a posição dos <i>primers CaMV35S</i> (<i>Forward</i>), <i>Bi</i> (<i>Forward</i>) e <i>Bi</i> (<i>Reverse</i>).....	60

- Figura 7 - Esquema representativo do vetor binário pNW166 que contém o cassete de expressão do gene *neo* que codifica para neomicina fosfotransferase (NPTII) sob o controle do promotor *CaMV35S* e o terminador da nopalina sintetase *T-Nos*. Apresenta o cassete de expressão do cDNA do gene *AtBI-1* fusionado ao *V5-His₆ tagged* sob o controle do promotor *CaMV35S* e o terminador da nopalina sintase *T-Nos*. Sítios de restrição: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; S, *Sac*I; X, *Xba*I. RB: borda direita; LB: borda esquerda..... 61
- Figura 8 - Esquema representativo do vetor pDM9 com 5764 pb que contém o cassete de expressão do cDNA do gene *AtBI-1* fusionado ao *V5-His₆ tagged* sob o controle do promotor *Ubi-1* e o terminador da nopalina sintase *T-Nos*. As setas indicam a posição dos *primers Ubi-1 (Forward)*, *Bi (Forward)* e *Bi (Reverse)*.. 61
- Figura 9 - Esquema representativo do plasmídeo pAHC20 que contém o cassete de expressão do gene *bar* que codifica para fosfinotricina acetiltransferase (BAR) sob o controle do promotor da ubiquitina do milho (*Ubi-1*) e o terminador da nopalina sintetase *T-Nos*. Sítios de restrição: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; P, *Pst*I; S, *Sac*I; Sa, *Sal*I; Sp, *Sph*I; T, *Tth*I; X, *Xba*I..... 62
- Figura 10 - Esquema representativo do plasmídeo pFF19G que contém o cassete de expressão do gene repórter *uid-A* (GUS) sob o controle do promotor *CaMV35S* e o terminador *35S polyA*. Sítios de restrição: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; K, *Kpn*I; N, *Nco*I; P, *Pst*I; S, *Sac*I; Sa, *Sal*I; Sm, *Sma*I; X, *Xba*I..... 63
- Figura 11 - (A) Folhas de fumo com a face abaxial voltada para cima, posicionada no centro da placa para o bombardeamento; (B) Folhas de fumo bombardeadas com o plasmídeo pFF19G apresentando expressão transitória do gene da β -glucoronidase *uid-A*. Cada ponto azul foi considerado expressão GUS nos experimentos de otimização..... 65
- Figura 12 - Caracterização do gene *AtBI-1*. (A) Histograma de distribuição dos genes no cromossomo 5 do genoma de *A. thaliana*. (B) A posição do gene *AtBI-1* no cromossomo 5 está entre 19,15 e 19,16 Mb. (C) O fragmento verde representa o gene propriamente dito; os blocos azuis representam as posições dos éxons; os blocos vermelhos representam os 6 domínios transmembrana da proteína

AtBI-1.....	82
Figura 13 - Alinhamento das sequências de aa das proteínas BI-1 de espécies Poaceae, e AtBI-1 de <i>A. thaliana</i> . Os pontos representam os aa que são idênticos aos de <i>A. thaliana</i> ; os traços representam <i>indel</i> (inserção / deleção de aminoácidos).....	83
Figura 14 - Árvore de máxima parcimônia obtida com as sequências de aa das proteínas BI-1 de espécies Poaceae, tendo AtBI-1 de <i>A. thaliana</i> como grupo externo. Os números indicam as porcentagens de <i>bootstrap</i> maiores que 50%.....	85
Figura 15 - Análise de restrição do plasmídeo pDM8 digerido com as enzimas de restrição <i>Bam</i> HI e <i>Eco</i> RI e separado em gel de agarose 1%. L: <i>1Kb plus DNA ladder</i> ; 1: Digestão de pDM8.....	86
Figura 16 - Análise de restrição do plasmídeo pDM9 digerido com enzimas de restrição <i>Hind</i> III e <i>Bam</i> HI e separado em gel de agarose 1%. L: <i>1Kb plus DNA ladder</i> ; 1: Digestão de pDM9.....	86
Figura 17 - (A) Parte do sequenciamento do cDNA <i>AtBI-1</i> que está fusionado ao <i>V5-His₆ tagged</i> , sendo apontadas as posições do cDNA <i>AtBI-1</i> , <i>V5</i> epitopo, região de polihistidina e o terminador T-Nos; (B) Análise da sequência <i>AtBI-1-V5-His₆</i> dos plasmídeos pDM8 e pDM9 através do <i>tBLASTx/NCBI</i>	87
Figura 18 - Esquema representativo dos métodos de transformação genética de cana-de-açúcar por biolística e <i>A. tumefaciens</i> . A: Aparelho acelerador de partículas utilizado para o bombardeamento de DNA precipitado às partículas de tungstênio ou ouro. B: Cultura de <i>A. tumefaciens</i> linhagem EHA 105, com o vetor binário pNW166, para incubação dos calos embriogênicos, podendo ser inoculação direta ou por agrobiolística. C: Calos em meio osmótico sob papel de filtro e dispostos em um círculo central para biolística ou agrobiolística. D: Seleção de células transformadas em meio seletivo com antibiótico. E: Regeneração de brotos em meio seletivo. F: Observação de brotos em lupa. G e H: Enraizamento de plântulas em meio seletivo. I: Plantas regeneradas sob aclimação em substrato.....	90
Figura 19 - Análise da presença do gene <i>neo</i> nos possíveis transformantes. Gel de agarose 1% mostrando produtos amplificados a partir de amostras de DNA de folhas	

de cana-de-açúcar. L: *1Kb plus DNA ladder*; colunas 1 a 15: plantas selecionadas da co-transformação pHA9/pDM8; colunas 16 a 28: plantas selecionadas da co-transformação pHA9/pDM9; C+: controle positivo (pHA9); C-: planta não transformada; H₂O: controle da reação..... 96

Figura 20 - Análise da presença do gene *neo* nos possíveis transformantes. Gel de agarose 1% mostrando produtos amplificados a partir de amostras de DNA de folhas de cana-de-açúcar. L: *1Kb plus DNA ladder*; colunas 1 a 3: plantas selecionadas da inoculação direta de calos em cultura de agrobactéria; colunas 4 e 5: plantas selecionadas da agrobiolística; C-: planta não transformada; C+: controle positivo (pNW166); H₂O: controle da reação..... 97

Figura 21 - Análise da presença do cDNA *AtBI-1* dirigido pelo promotor *CaMV35S* nos possíveis transformantes. Gel de agarose 1% mostrando produtos amplificados a partir de amostras de DNA de folhas de cana-de-açúcar. L: *1Kb plus DNA ladder*; colunas 1 a 5: plantas selecionadas da inoculação direta de calos em cultura de agrobactéria; colunas 6 a 10: plantas selecionadas da agrobiolística; colunas 11 a 16: plantas selecionadas da co-transformação com pHA9 e pDM8; C-: planta não transformada; H₂O: controle da reação; C+: controle positivo (pDM8)..... 98

Figura 22 - Análise da presença do cDNA *AtBI-1* dirigido pelo promotor *Ubi-1* nos possíveis transformantes. Gel de agarose 1% mostrando produtos amplificados a partir de amostras de DNA de folhas de cana-de-açúcar. L: *1Kb plus DNA ladder*; colunas 1 a 10: plantas selecionadas da co-transformação com pHA9 e pDM9; C-: planta não transformada; H₂O: controle da reação; C+: controle positivo (pDM9)..... 98

Figura 23 - Amostras de RNA total de folhas de cana-de-açúcar, extraído pelo método do Trizol. Gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídeo. Coluna 1: RNA total da planta não transformada; colunas 2 a 11: RNA total de plantas transformadas..... 100

Figura 24 - Normalização do RT-PCR com *primers* da β -actina de cana-de-açúcar. L: *1Kb plus DNA ladder*; C-: planta não transformada; colunas 1 a 6: plantas da co-transformação com pHA9 e pDM8; colunas 7 a 12: plantas da co-

- transformação com pHA9 e pDM9..... 100
- Figura 25 - Normalização do RT-PCR com *primers* da β -actina de cana-de-açúcar. L: *1Kb plus DNA ladder*; C-: planta não transformada; colunas 1 a 6: plantas da transformação por inoculação direta (ID) de calos em cultura de agrobactéria; colunas 7 a 12: plantas da transformação por agrobiolística (AB)..... 101
- Figura 26 - Análise de expressão do cDNA *AtBI-1* por RT-PCR nas plantas transformadas por co-transformação com pHA9. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, mostrando produtos de amplificação por PCR a partir de amostras de cDNA total de folhas de cana-de-açúcar não transformada e plantas transformadas. L: *1Kb plus DNA ladder*; C-: planta não transformada; colunas 1 a 6: plantas transformadas com pDM9 na ordem – pDM9-1, pDM9-2, pDM9-3, pDM9-4, pDM9-5, pDM9-6; colunas 7 a 12: plantas transformadas com pDM8 na ordem – pDM8-1, pDM8-2, pDM8-3, pDM8-4, pDM8-5, pDM8-6 ; C+: plasmídeo pDM9..... 101
- Figura 27 - Análise de expressão do cDNA *AtBI-1* por RT-PCR nas plantas transformadas por *A. tumefaciens* linhagem EHA105, contendo vetor binário pNW166. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, mostrando produtos de amplificação por PCR a partir de amostras de cDNA total de folhas de cana-de-açúcar não transformada e plantas transformadas. L: *1Kb plus DNA ladder*; C-: planta não transformada; colunas 1 a 6: plantas transformadas por agrobiolística na ordem – AB-1, AB-2, AB-3, AB-4, AB-5, AB-6; colunas 7 a 12: plantas transformadas por inoculação direta dos calos com agrobactéria na ordem – ID-1, ID-2, ID-3, ID-4, ID-5, ID-6; C+: plasmídeo pDM8..... 102
- Figura 28 - Análise de imunodeteção da proteína AtBI-1-V5His₆ nas folhas jovens de plantas transgênicas obtidas por co-transformação, usando o anticorpo primário anti-V5 e o anticorpo secundário Anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina. (A) Aproximadamente 60 μ g de proteína total de cada planta foram separadas em SDS-PAGE 12%, mostrando que foram utilizadas quantidades similares de proteínas na imunodeteção. (B) Proteínas transferidas para a membrana de nitrocelulose incubada com os

anticorpos primário e secundário. M: Marcador de médio peso molecular; C-: extrato bruto da cana não transformada; colunas 1 a 8: extrato bruto das canas transformadas, na ordem: pDM8-1, pDM8-2, pDM8-3, pDM8-5, pDM9-1, pDM9-2, pDM9-3, pDM9-4..... 106

Figura 29 - Análise de imunodeteção da proteína AtBI-1-V5His₆ em folhas jovens de plantas transgênicas obtidas por transformação via *A. tumefaciens*, usando o anticorpo primário anti-V5 e o anticorpo secundário Anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina. (A) Aproximadamente 60 µg de proteína total de cada planta foram separadas em SDS-PAGE 12%, mostrando que foram utilizadas quantidades similares de proteínas na imunodeteção. (B) Proteínas transferidas para a membrana de nitrocelulose incubada com os anticorpos primário e secundário. M: Marcador de médio peso molecular; C-: extrato bruto da cana não transformada; colunas 1 a 8: extrato bruto das canas transformadas, na ordem: AB-1, AB-3, AB-4, AB-5, AB-6, ID-3, ID-4, ID-5... 107

Figura 30 - Comparação do nível de expressão da proteína AtBI-1-V5His₆ em folhas jovens de plantas transgênicas obtidas pelos métodos de biolística e *A. tumefaciens*. Análise de imunodeteção usando o anticorpo primário anti-V5 e o anticorpo secundário Anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina. (A) Aproximadamente 20 µg de proteína total de cada planta foram separadas em SDS-PAGE 12%, mostrando que foram utilizadas quantidades similares de proteínas na imunodeteção. (B) Proteínas transferidas para a membrana de nitrocelulose incubada com os anticorpos primário e secundário. M: Marcador de médio peso molecular; C-: extrato bruto da cana não transformada; colunas 1 a 8: extrato bruto das canas transformadas, na ordem: ID-3, ID-5, AB-1, AB-5, pDM8-1, pDM8-2, pDM9-3, pDM9-4..... 108

Figura 31 - Análise *Southern* para certificação do número de cópias do cDNA *AtBI-1* nas linhagens transgênicas de cana-de-açúcar selecionadas. As amostras de DNA genômico foram digeridas com a enzima de restrição *NcoI*, gerando fragmentos que contêm o transgene. (A) Gel de agarose 1% (tampão TAE 1x, 3 V.cm⁻¹) corado com brometo de etídio contendo o DNA da sonda e amostras de DNA genômico digeridas da planta não transformada e das plantas

transgênicas. (B) Filme de raio-X após exposição da membrana de nylon hibridizada com a sonda. L: *1Kb plus DNA ladder*; S: Sonda que é a sequência *AtBI-1-V5His₆ :: T-Nos* de 1000 pb; colunas C- a 4: DNAs genômicos digeridos com a enzima *NcoI*; C-: planta não transformada; 1: planta transgênica pDM8-1; 2: planta transgênica pDM9-3; 3: planta transgênica ID-3, 4: planta transgênica AB-1.....

111

Figura 32 - Análise *Southern* para certificação do número de cópias do cDNA *AtBI-1* nas linhagens transgênicas de cana-de-açúcar selecionadas. As amostras de DNA genômico foram digeridas com a enzima de restrição *HindIII*, gerando fragmentos que contêm o transgene. (A) Gel de agarose 1% (tampão TAE 1x, 3 V.cm⁻¹) corado com brometo de etídio contendo o DNA da sonda e amostras de DNA genômico digeridas da planta não transformada e das plantas transgênicas. (B) Filme de raio-X após exposição da membrana de nylon hibridizada com a sonda. L: *1Kb plus DNA ladder*; S: Sonda que é a sequência *AtBI-1-V5His₆ :: T-Nos* de 1000 pb; colunas C- a 4: DNAs genômicos digeridos com a enzima *HindIII*; C-: planta não transformada; 1: planta transgênica pDM8-1; 2: planta transgênica pDM9-3; 3: planta transgênica ID-3, 4: planta transgênica AB-1.....

112

Figura 33 - Análise *Southern* para certificação da presença do cDNA *AtBI-1* nas linhagens transgênicas de cana-de-açúcar selecionadas. As amostras de DNA genômico foram digeridas com as enzimas de restrição *BamHI* e *EcoRI*, liberando o fragmento que corresponde a *AtBI-1-V5His₆ :: T-Nos*. (A) Gel de agarose 1% (tampão TAE 1x, 3 V.cm⁻¹) corado com brometo de etídio contendo o DNA da sonda, DNA genômico não digerido da planta transgênica pDM9-3, e amostras de DNA genômico digeridas da planta não transformada e das plantas transgênicas. (B) Filme de raio-X após exposição da membrana de nylon hibridizada com a sonda. L: *1Kb plus DNA ladder*; S: Sonda que é a sequência *AtBI-1-V5His₆ :: T-Nos* de 1000 pb; T: DNA genômico não digerido de pDM9-3; colunas C- a 4: DNAs genômicos digeridos com as enzimas *BamHI* e *EcoRI*; C-: planta não transformada; 1: planta transgênica pDM8-1; 2: planta transgênica pDM9-3; 3: planta transgênica ID-3, 4: planta

transgênica AB-1.....	114
Figura 34 - Efeito da TM no alongamento do sistema radicular das plantas não transformadas (Controle) e plantas transgênicas ID-3, AB-1, pDM8-1, pDM9-3 e pDM9-4. Plantas com quatro semanas de idade foram submetidas aos tratamentos T1 (sem TM), T2 (0,5 mg.L ⁻¹ TM) e T3 (1,0 mg.L ⁻¹ TM) por 10 dias. O comprimento vertical do sistema radicular (mm) foi determinado no 1°, 4°, 7° e 10° dias. Barras e barras de erros representam a média ± desvio padrão de 10 repetições nos 2 experimentos.....	117
Figura 35 - Fenótipo do sistema radicular das plantas não transformadas (Controle) e plantas transgênicas ID-3, AB-1, pDM8-1, pDM9-3 e pDM9-4 incubadas em meio MS líquido com os tratamentos T1 (sem TM), T2 (0,5 mg.L ⁻¹ TM) e T3 (1,0 mg.L ⁻¹ TM) e visualizadas na lupa no 10° dia após a incubação.....	118
Figura 36 - Fenótipo das plantas não transformadas (Controle) e plantas transgênicas ID-3, AB-1, pDM8-1, pDM9-3 e pDM9-4 crescidas em meio MS líquido com os tratamentos T1 (sem TM), T2 (0,5 mg.L ⁻¹ TM) e T3 (1,0 mg.L ⁻¹ TM) após 12 dias de incubação.....	122
Figura 37 - Efeito da TM no conteúdo de clorofila total das plantas não transformadas (Controle) e plantas transgênicas ID-3, AB-1, pDM8-1, pDM9-3 e pDM9-4 crescidas em meio MS líquido com os tratamentos T1 (sem TM), T2 (0,5 mg.L ⁻¹ TM) e T3 (1,0 mg.L ⁻¹ TM) após 12 dias de incubação. Barras e barras de erros representam a média ± desvio padrão de 10 repetições nos 2 experimentos.....	123
Figura 38 - Hipotético envolvimento das proteínas AtBI-1 e SoBI-1 na regulação da MCP nas canas-de-açúcar transgênicas. A tunicamicina ativa a expressão do <i>SoBI-1</i> endógeno, ao passo que <i>AtBI-1</i> apresenta expressão constitutiva. Os fatores endógenos e o estresse ambiental podem induzir a MCP. Espécies reativas de oxigênio (ROS), alto nível de Ca ⁺² citosólico e a liberação de citocromo c podem induzir a MCP e reações de estresse isoladas ou em combinação entre elas. Finalmente, a MCP depende da atividade proteolítica, que pode ser direta ou indiretamente controlada pela função de AtBI-1 e SoBI-1. Estas proteínas	

aparentemente trabalham após ou independente da liberação do citocromo c. Sugere-se que a expressão de gene *SoBI-1* pode ser regulada por fatores de estresse e antes dos reguladores da MCP e/ou ativada por um mecanismo que monitora a função mitocondrial, quantidades de ROS e/ou Ca^{+2} (Hückelhoven, 2004, modificado).....

125

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Escolha da fase de subcultivo para bombardeamento dos calos de cana-de-açúcar, variedade RB835089.....	79
Tabela 2 - Matriz de identidade (%) entre as sequências de aa das proteínas BI-1 de espécies Poaceae e AtBI-1*.....	84
Tabela 3 - Resultado da co-transformação de cana-de-açúcar, variedade RB835089, com os plasmídeos pHA9 e pDM8 (<i>CaMV35S :: AtBI-1-V5His₆ :: T-Nos</i>)....	92
Tabela 4 - Resultado da co-transformação de cana-de-açúcar, variedade RB835089, com os plasmídeos pHA9 e pDM9 (<i>Ubi-1 :: AtBI-1-V5His₆ :: T-Nos</i>).....	92
Tabela 5 - Resultado da transformação genética de cana-de-açúcar, variedade RB835089, mediada pela inoculação direta dos calos em cultura de <i>A. tumefaciens</i> , linhagem EHA105, que contém o vetor binário pNW166.....	93
Tabela 6 - Resultado da transformação genética de cana-de-açúcar, variedade RB835089, por agrobiolística com <i>A. tumefaciens</i> , linhagem EHA105, que contém o vetor binário pNW166.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

A	Adenina
AB	Cana-de-açúcar transgênica obtida pela técnica de agrobiolística
Act-1	Promotor da actina-1 do arroz
AtBI-1	<i>Arabidopsis thaliana Bax Inhibitor-1</i>
BI-1	<i>Bax Inhibitor-1</i> (Inibidor da Bax-1)
BIOEN	Bioenergia
BSA	Albumina de soro bovina
C	Citosina
<i>CaMV35S</i>	Promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor
Cb5	Citocromo <i>b5</i>
cDNA	DNA complementar ao mRNA
CKs	Citocininas
CLP	<i>Caspase like-protein</i>
CTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
ddH ₂ O	Água destilada, deionizada (Milli-Q) e autoclavada
DEPC	Dietilpirocarbonato
DH5- α	Cepa de células competentes de <i>Escherichia coli</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNAse I	Desoxirribonuclease I
dNTP	Deoxirribonucleosídeos Trifosfato (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EST	<i>Expressed sequence tag</i>
<i>Forward</i>	<i>Primer Direto</i>
G	Guanina
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
HR	Reação de hipersensibilidade
HvBI-1	<i>Hordeum vulgare Bax Inhibitor-1</i>
ID	Cana-de-açúcar transgênica obtida pela técnica de incubação direta dos calos em cultura de agrobactéria

<i>Indel</i>	Inserção e deleção de aminoácido
Kb	Kilobases
MCP	Morte celular programada
mRNA	RNA mensageiro
MS	Meio basal de Murashige e Skoog (1962)
<i>neo</i> (NPTII)	Neomicina fosfotransferase II
NtBI-1	<i>Nicotiana tabacum Bax Inhibitor-1</i>
OsBI-1	<i>Oryza sativa Bax Inhibitor-1</i>
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG	Polietilenoglicol
RE	Retículo endoplasmático
<i>Reverse</i>	<i>Primer</i> reverso
RNase	Ribonuclease
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa, seguida da reação da polimerase em cadeia
SAR	Resistência sistêmica adquirida
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio-eletroforese em gel de poliacrilamida
T	Timina
TAE	Tampão de eletroforese Tris – Acetato – EDTA
T-DNA	<i>Transferred DNA</i>
TEMED	N', N', N', N'-Tetrametil-etileno-diamina
Ti	<i>Tumour-inducing</i>
TIGR	<i>The Institute for Genomic Research</i>
TM	Tunicamicina
T-Nos	Terminador da nopalina sintase
TRIS	Tris-hidroxiaminometano
TTBS	Tampão Tris, NaCl e Tween 20
<i>Ubi-1</i>	Promotor do gene da ubiquitina do milho
UPR	Resposta a proteínas mal-dobradas

V.cm ⁻¹	Volts.cm ⁻¹
V5- <i>His6</i>	V5 epitope tag e <i>His6</i> tag para avaliar a expressão gênica por <i>Western blot</i>
<i>vir</i>	Genes de virulência
x g	Múltiplos de força gravitacional terrestre (rcf)
WT	<i>Wild-type</i> (selvagem)

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) apresenta significativa importância socioeconômica para o sistema agroindustrial do Estado de São Paulo e do Brasil, e tem adquirido considerável destaque no âmbito científico e tecnológico com grandes investimentos na biotecnologia da cultura. Os projetos SUCEST e BIOEN financiados pela FAPESP são exemplos de investimentos que estimulam o desenvolvimento da pesquisa, promovendo o avanço do conhecimento dos genes expressos do genoma da cana-de-açúcar e sua aplicação biotecnológica em áreas relacionadas à produção de bioenergia no Brasil. Estes acontecimentos abrem novas e importantes oportunidades para o melhoramento da produção do biocombustível da cana-de-açúcar.

Diversos trabalhos relacionados ao melhoramento genético de cana-de-açúcar foram realizados até o momento, visando incorporar diversas características de interesse agrônomo nas variedades da cultura. A cana-de-açúcar apresenta características que a tornam uma excelente planta para o melhoramento através da transformação genética, como a sua facilidade para regeneração de plantas a partir de calos *in vitro* e ao seu modo de multiplicação em escala comercial por propagação vegetativa que possibilitaria a distribuição de transformantes estáveis aos produtores através de mudas.

Vários métodos de transformação genética foram testados em cana-de-açúcar, entretanto, o principal método é a biolística. Pesquisas voltadas para a geração de metodologias de transformação vegetal devem ser estimuladas, considerando que a transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* é uma alternativa a ser estudada e aplicada em cana-de-açúcar com maior frequência. Muitos fatores que influenciam a transformação de monocotiledôneas mediada por *Agrobacterium* foram pesquisados. Estes fatores incluem o genótipo da planta, o tipo de explante, a linhagem de *Agrobacterium*, e o vetor binário. Em adição, várias condições de inoculação e co-cultivo, além dos marcadores seletivos e promotores que dirigem estes genes mostraram influenciar a frequência estável de transformação.

Dessa forma, a incorporação de métodos de transformação genética em programas de melhoramento clássico se mostra interessante, sendo possível inserir transgenes no genoma da cana-de-açúcar visando à obtenção de variedades tolerantes a diferentes estresses bióticos e abióticos que induzem perturbações metabólicas e ativam o processo de morte celular

programada. Estes estresses afetam de maneira negativa o crescimento, metabolismo e produtividade da cana-de-açúcar. A identificação e caracterização molecular de genes agronomicamente interessantes relacionados aos mecanismos de estresse e de morte celular programada são importantes desafios para a genômica funcional em função da necessidade iminente de aumentar a produção de cana-de-açúcar, buscando obter variedades produtivas e adaptadas a ambientes brasileiros diversos.

A morte celular programada é geneticamente definida como um processo associado a características morfológicas e bioquímicas distintas que envolvem vias de sinalização controlando a destruição das células com o mínimo dano às células vizinhas. Este processo é parte integral do ciclo celular de organismos multicelulares, e pode ser induzido por vários estímulos ambientais ou de desenvolvimento do organismo, ocorrendo em plantas durante os processos de desenvolvimento, tais como senescência, embriogênese, desenvolvimento do tecido vascular e durante o processo de interação da planta com um patógeno.

Alguns exemplos de estímulos bióticos e abióticos que ativam o mecanismo de morte em células de plantas são: ataque de patógenos, H_2O_2 , salinidade, falta ou excesso de água, calor e frio. As respostas celulares a estes estímulos podem ser a disfunção mitocondrial, condensação da cromatina, fragmentação do DNA nuclear, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), e ativação de proteases específicas como caspases.

O gene *AtBI-1* isolado de *Arabidopsis thaliana* expressa uma proteína citoprotetora localizada na membrana do retículo endoplasmático que apresenta homólogos em outros organismos. Este gene é induzido durante a senescência e sob várias situações de estresses bióticos e abióticos, e nestas condições modula o mecanismo de morte celular programada.

Portanto, o presente trabalho teve como objetivos comparar os métodos de biolística e *A. tumefaciens* para transformação genética de cana-de-açúcar variedade RB835089, e conjuntamente estudar a expressão heteróloga do cDNA do gene *AtBI-1* em cana, visando obter informações sobre o mecanismo da morte celular programada. Para confirmação da expressão do cDNA *AtBI-1* em plantas de cana-de-açúcar transformadas, foi realizado o bioensaio com o indutor de estresse no retículo endoplasmático, o antibiótico tunicamicina. A seleção de plantas transgênicas de cana expressando o cDNA *AtBI-1* poderá ser uma alternativa para reduzir as perdas causadas por estresses como ataque de patógenos, seca, salinidade e frio, possibilitando atenuar os efeitos negativos da morte celular programada.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) pertence à família botânica Poaceae, sendo originária do Sudeste Asiático, da grande região central da Nova Guiné e Indonésia (DANIELS; ROACH, 1987). Ela é uma das mais importantes espécies vegetais cultivadas em todo o mundo, principalmente nas regiões tropicais e sub-tropicais, com uma área maior que 20 milhões de hectares distribuídos em 121 países (FAO, 2009).

As variedades atualmente cultivadas de cana-de-açúcar são resultado de hibridização interespecífica envolvendo as espécies *S. officinarum* L. ($2n = 80$ cromossomos), a qual contribui com o alto teor de sacarose, e *S. spontaneum* L. ($2n = 40-128$ cromossomos) responsável pelo vigor vegetativo e resistência a estresses bióticos e abióticos (MING et al., 2001), seguida de repetidos retrocruzamentos com *S. officinarum* L. De acordo com Roach (1989), citado por Lakshmanan et al. (2005), poucos clones de *S. officinarum* L. e *S. spontaneum* L. foram utilizados no desenvolvimento destes primeiros híbridos. Os programas modernos de melhoramento de cana-de-açúcar, em sua maioria, contam com extensivos cruzamentos de variedades elites derivadas desses híbridos iniciais (LAKSHMANAN et al., 2005), o que representa a estreita base genética.

A importância econômica desta cultura é grande, visto que é fonte de matéria-prima para a produção de açúcar, álcool (etanol) e biomassa para a alimentação animal. O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo e líder mundial na produção de álcool de cana, com planos ambiciosos para aumentar significativamente a produção de biocombustíveis no futuro. O Estado de São Paulo concentra a maior produção de cana-de-açúcar do país, correspondendo a 60% da safra brasileira (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR - UNICA, 2009). A franca expansão do setor, diante de um cenário bastante promissor para os próximos anos, é salientada pelas centenas de projetos para instalação de usinas e destilarias ao longo do território brasileiro, principalmente na região Centro-Sul do país. Ademais, vem ocorrendo o avanço da área cultivada com cana-de-açúcar, principalmente sobre terras ocupadas com pastagens.

A previsão da produção de cana no Brasil para a safra 2008/2009 indica que o total dessa matéria-prima que será processada pelo setor sucroalcooleiro deverá atingir um montante de 558,72 milhões de toneladas, colhidos de uma área de cerca de 6,7 milhões de hectares,

correspondendo a 11,4% a mais do que os 501,54 milhões de toneladas processadas na safra passada (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2009). Metade da produção é destinada à fabricação de álcool, o que faz do Brasil o segundo maior produtor do combustível no mundo. O primeiro lugar cabe aos Estados Unidos que extraem álcool do milho. O Brasil produz 13% das 157,6 milhões de toneladas de açúcar do mundo e, baseando-se no valor, o açúcar e o álcool são a terceira e a oitava maior exportação importante do país, respectivamente (JAMES, 2006).

Apesar da indispensável relevância do açúcar proveniente da cana, o principal responsável pela recente projeção do setor é o álcool, em resposta a crescente preocupação das economias mundiais com a segurança do abastecimento de energia para os meios de transporte e, a necessidade de se reduzir emissões de dióxido de carbono (CO₂), responsável pelo aquecimento global. O aumento pela demanda interna de álcool, frente ao crescimento da frota de veículos bicomcombustíveis, e a valorização do combustível brasileiro no cenário internacional, impulsionam o crescimento do setor sucroalcooleiro nacional.

A agroindústria canavieira é responsável por gerar milhões de empregos na área, o que evidencia a importância social da cultura (RIBEIRO, 2007), com a geração de divisas através da exportação de açúcar e álcool e pelo aproveitamento racional da biomassa vegetal. O bagaço da cana-de-açúcar é de grande interesse para o setor energético, podendo ser utilizado na co-geração de energia elétrica. As fibras podem ainda servir de matéria-prima para diversos produtos como papel, chapas aglomeradas, ração animal, etc. O emprego destes resíduos que anteriormente eram descartados contribui para o desenvolvimento sustentável e para a geração de recursos do Brasil (FELIX, 2006).

A qualidade dos vários produtos e subprodutos gerados com o processamento da cana-de-açúcar é dependente em grande parte da qualidade do insumo que chega até as usinas. Fatores como a variedade de cana-de-açúcar utilizada, condições de solo e clima em que a cana foi cultivada, estágio de maturação da cana no momento da colheita, pureza do mosto, entre outros, podem interferir na qualidade do insumo e consequentemente na qualidade do produto final. Deste modo, uma importante estratégia para se obter o aumento da produtividade e da qualidade é a utilização de variedades melhoradas.

A cana-de-açúcar, além da significativa importância socioeconômica para o sistema agroindustrial do Estado de São Paulo e do Brasil, tem adquirido considerável destaque no

âmbito científico e tecnológico com os resultados do sequenciamento dos genes expressos do genoma da cana (*Expressed Sequence Tags* - ESTs) e da categorização de cerca de 240 mil fragmentos de genes (PROJETO SUCEST/FAPESP), cujas funções já estão sendo estudadas. Isto demonstra que o Brasil faz investimentos significativos na biotecnologia da cana-de-açúcar, sendo que em julho de 2008 a FAPESP lançou o Programa de Pesquisa em Bioenergia (BIOEN) que objetiva estimular e articular atividades de pesquisa e desenvolvimento utilizando laboratórios acadêmicos e industriais para promover o avanço do conhecimento e sua aplicação em áreas relacionadas à produção de bioenergia no Brasil. Estes acontecimentos abrem novas e importantes oportunidades para a melhoria da produtividade do biocombustível da cana-de-açúcar por meio da aplicação de biotecnologia.

2.2 Transformação genética

Pesquisas relacionadas ao melhoramento genético têm levado a aumentos consideráveis na produtividade de diversas espécies cultivadas através de variadas abordagens metodológicas para a obtenção de maior ganho genético após a seleção.

A tecnologia do DNA recombinante possibilitou o isolamento de genes e a inserção estável em um genoma hospedeiro (QUECINI; VIEIRA, 2001). Esta técnica, também chamada de transformação genética, pode ser definida como a introdução controlada de ácidos nucleicos (DNA) em um genoma receptor, excluindo-se a introdução por fecundação. É um processo controlado, onde apenas o fragmento definido de DNA é introduzido no genoma do hospedeiro, ou genoma receptor, devendo ser a ele integrado (BRASILEIRO; DUSI, 1999). A inserção estável dessas moléculas em um genoma hospedeiro dá origem a um indivíduo igual ao receptor da molécula recombinante, porém acrescido de uma característica nova e particular (QUECINI; VIEIRA, 2001).

Existem diversas técnicas de transformação genética de plantas agrupadas em duas categorias: transferência indireta e direta de genes. A indireta é aquela em que o DNA exógeno é inserido no genoma pela ação de um vetor biológico, enquanto que a direta é baseada em processos físico-bioquímicos.

A transformação indireta baseia-se principalmente no sistema mediado por bactérias do gênero *Agrobacterium* e, tem sido o método mais utilizado para obtenção de plantas transgênicas. *Agrobacterium tumefaciens* e *A. rhizogenes* são bactérias fitopatogênicas de solo, gram negativas,

pertencentes à família Rhizobiaceae, que causam doenças em dicotiledôneas, conhecidas como galhas da coroa e raiz em cabeleira, respectivamente. Nesta interação planta-patógeno ocorre um processo de transferência natural de genes entre a agrobactéria e a célula vegetal, quando fragmentos de DNA bacteriano (T-DNA) são transferidos para dentro da célula vegetal, integrando-se ao genoma nuclear (REAM; GELVIN, 1996). Em sua forma natural, a bactéria transfere o T-DNA (*Transferred DNA*), que é parte do plasmídeo bacteriano denominado Ti (*tumour-inducing*), e este se integra ao genoma das células de plantas infectadas. No fragmento de T-DNA que é transferido para a célula vegetal estão os genes envolvidos na biossíntese constitutiva de fitohormônios (auxinas e citocininas) que alteram o programa de desenvolvimento normal do tecido infectado, ocasionando a formação do tumor. Além disso, contém também oncogenes para a síntese de açúcares e aminoácidos denominados de opinas, que são responsáveis pela sobrevivência da bactéria, que os utilizam como fonte de carbono e nitrogênio (OGER; PETIT; DESSAUX, 1997).

Extremidades repetidas de 25 pares de base (pb) nas bordas direita e esquerda delimitam o T-DNA e são necessárias para a transferência do mesmo (WANG et al., 1984). Compostos fenólicos liberados pelos tecidos vegetais lesionados ativam regiões específicas (*vir*), iniciando o processo de transferência do T-DNA para a célula vegetal (STACHEL et al., 1985). A *Agrobacterium* possui também genes cromossômicos (*chv*) que garantem a ligação entre as células bacteriana e hospedeira, permitindo a formação do poro de passagem do complexo contendo a fita – T (SHENG; CITOVSKY, 1996).

A região de virulência, denominada região *vir* é responsável pelo processo de transferência, sendo que o processo de indução e transferência da fita - T é controlado pela expressão coordenada dessa região. O *locus virA* codifica uma proteína de membrana que percebe a presença de metabólitos da planta injuriada (acetoseringona). Ao se ligar a acetoseringona, a proteína VirA “ativada” modifica a proteína VirG, que também é expressa constitutivamente, mas em menor escala através da fosforilação da mesma. A proteína VirG fosforilada é responsável pela indução da transcrição de toda região *vir*. Para formar a fita – T, o operon *virD* codifica endonucleases capazes de reconhecer e clivar dentro dos 25 pb que delimitam a região-T. A transferência da fita – T é polar, sempre da direita para a esquerda. A fita-T é transferida para a célula vegetal na forma de fita simples, protegida na porção 5' da molécula pela proteína VirD2, ao longo da fita – T, pela proteína VirE2 (ZAMBRYSKI, 1992). O

T-DNA liberado é protegido por ligações ao longo da fita simples pela proteína VirE2, que também seria responsável pela organização estrutural da fita durante o trajeto entre a célula bacteriana e a célula vegetal. Proteínas codificadas pelos *locus virB* garantiriam a passagem pela membrana da bactéria, pela formação de poro de passagem entre a membrana e a parede celular (ZAMBRYSKI, 1992).

Uma vez que o segmento a ser transferido é definido por suas bordas, a região codificadora do T-DNA do tipo selvagem pode ser substituída por qualquer outra sequência de DNA sem que sua transferência da *Agrobacterium* para a planta seja prejudicada. A substituição dos oncogenes por genes de interesse, flanqueados pelas bordas do T-DNA, fornece um sistema eficiente de obtenção de plantas transgênicas (BRASILEIRO; DUSI, 1999).

Os vetores utilizados para a transformação via *A. tumefaciens* são chamados de “desarmados”, isto é, não possuem os oncogenes em seu plasmídeo, mas retêm os genes de virulência (região *vir*), localizados no plasmídeo Ti (REAM; GELMIN, 1996). Estas construções de plasmídeos possuem promotores de plantas e genes bacterianos que conferem resistência a antibióticos, fazendo com que estes marcadores sejam eficientes para a seleção de células ou plantas transformadas. Assim, a *A. tumefaciens* é utilizada como vetor de transformação, onde o fragmento de T-DNA é eliminado e substituído por um gene de interesse (SACIOTO, 2003), perdendo a capacidade de causar tumores, porém sendo capaz de transferir o DNA exógeno. Explantes inoculados com as linhagens desarmadas têm capacidade regenerativa e grande porcentagem de produção de plantas transgênicas (BRASILEIRO, 1998).

A transformação direta como o processo de transformação por eletroporação consiste na indução temporária de poros nas membranas celulares de protoplastos, produzidos por um campo elétrico permitindo, assim, a passagem de íons e moléculas, como a de DNA contendo os transgenes. Este método é pouco utilizado em monocotiledôneas (BIRCH, 1997).

Já a transformação direta pelo método de transformação por biolística consiste na aceleração de micropartículas que atravessam a parede celular e a membrana plasmática, de forma não letal, carregando substâncias adsorptivas, como DNA, para o interior da célula (FERREIRA et al., 2004). São utilizados microprojéteis de ouro ou tungstênio, com diâmetro em torno de 1 µm, nos quais são precipitadas as moléculas de DNA. Os microprojéteis carregam moléculas de DNA precipitadas na superfície, que são liberadas, sendo que algumas atingem o núcleo da célula vegetal e, em baixa frequência, conseguem integrar-se de forma aleatória no

genoma (KLEIN et al., 1987). O tipo de aparelho usado para acelerar as micropartículas envolvidas pelo DNA pode ter propulsão a ar, pólvora, gás hélio ou eletricidade (FERREIRA et al., 2004).

2.2.1 Transformação genética de cana-de-açúcar

A complexidade do genoma poliplóide e aneuplóide das variedades de cana-de-açúcar (D'HONT; GLASZMANN, 2005), somada a sua base genética relativamente restrita, impõem grandes dificuldades à aplicação de técnicas do melhoramento tradicional. Mas ainda hoje o melhoramento tradicional é importante para obtenção das variedades existentes de cana-de-açúcar. Trata-se de um processo laborioso, com resultados obtidos em longo prazo, dependendo-se de 12 a 15 anos para o lançamento de uma nova variedade. O sucesso de um programa de melhoramento depende de estudos preliminares no local de cruzamento, para que se conheça a época de florescimento; o comportamento da abertura das anteras e; a viabilidade do pólen de cada variedade participante do cruzamento, atentando também para os problemas citogenéticos e os mecanismos de incompatibilidade genética ou citoplasmática que poderão influenciar se um cruzamento será bem sucedido, ou não (CESNIK; MIOCQUE, 2004).

Diante desta situação, a biotecnologia pode ser aplicada nos programas de melhoramento para superar ou reduzir algumas das limitações associadas às abordagens convencionais, assim como aumentar a produtividade de biocombustível de cana. Para isto, algumas características podem ser incorporadas à cultura por meio da engenharia genética, através da transformação genética de plantas, para reduzir as perdas com estresses bióticos associados com pragas, plantas daninhas e doenças, e estresses abióticos relacionados à seca, frio, salinidade entre outros. A biotecnologia também pode fazer mudanças para otimizar o conteúdo e a qualidade do açúcar.

A cana-de-açúcar apresenta características que a tornam uma excelente planta para o melhoramento através da transformação genética, como a sua facilidade para regeneração de plantas a partir de calos *in vitro* (HEINZ et al., 1977; IRVINE, 1984; CHEN et al., 1988) e, ao seu modo de multiplicação em escala comercial por propagação vegetativa que possibilitaria a distribuição de transformantes estáveis aos produtores através de mudas (GALLO-MEAGHER; IRVINE, 1996).

Na última década, várias pesquisas foram realizadas para desenvolver eficientes métodos de transformação genética de cana-de-açúcar (CHEN et al., 1987; BOWER; BIRCH, 1992;

RATHUS; BIRCH, 1992; SMITH et al., 1992; BIRCH; MARETZKI, 1993; GAMBLEY; FORD; SMITH, 1993; GAMBLEY et al., 1994; BIRCH, 1997; ARENCIBIA et al., 1998; ELLIOTT; BRETELL; GROF, 1998; ENRIQUEZ-OBREGON et al., 1998; MANICKAVASAGAM et al., 2004). Diferentes técnicas de transformação usando eletroporação (RATHUS; BIRCH, 1992), tratamento com polietilenoglicol (PEG) (CHEN et al., 1987), bombardeamento de micropartículas (FRANKS; BIRCH, 1991) e *Agrobacterium tumefaciens* (ARENCIBIA et al., 1998; ELLIOTT; BRETELL; GROF, 1998) foram utilizadas para introduzir genes marcadores em células e calos de cana. As primeiras células de cana transgênicas foram obtidas seguindo a transferência de DNA para protoplastos mediada por PEG (CHEN et al., 1987). Apesar de ser um procedimento simples que requer equipamentos pouco especializados, a transformação mediada por PEG não recebeu muita atenção devido a sua baixa eficiência e baixa reprodutibilidade. A eficiência de transformação de um para 106 protoplastos tratados foi relatada para a variedade F164 (CHEN et al., 1987).

A transformação de cana por eletroporação se mostrou relativamente mais reprodutível do que o método PEG. Calos transformados foram obtidos de protoplastos eletroporados de diferentes variedades de cana (CHOWDHURY; VASIL, 1992; RATHUS; BIRCH, 1992). Rathus e Birch (1992) documentaram um evento de transformação para 102 a 104 protoplastos eletroporados para as variedades Q63 e Q96. Entretanto, a baixa regeneração de protoplastos inviabilizou a aplicação desta metodologia. No entanto, plantas de cana transgênicas foram obtidas seguindo a eletroporação de células embriogênicas intactas (ARENCIBIA et al., 1995) e de tecidos meristemáticos de plantas crescidas *in vitro* (ARENCIBIA et al., 1992).

As primeiras tentativas de transformar a cana utilizando *Agrobacterium tumefaciens*, com ou sem indutores do gene de virulência e outros tratamentos que melhoram a infecção, encontraram pouco sucesso (BIRCH; MARETZKI, 1993). Entretanto, Arencibia et al. (1998) foram capazes de regenerar plantas de cana transgênicas morfológicamente normais seguindo o co-cultivo de calos com *A. tumefaciens* linhagens LBA4404 e EHA101. Quase simultaneamente, Enriquez-Obregon et al. (1998) relataram a produção de plantas de cana resistentes ao herbicida comercial BASTA (componente ativo: fosfinotricina) através da transformação mediada por *Agrobacterium* usando uma linhagem bacteriana diferente: C58C1 Rif^R (At2260). Pela manipulação de várias etapas de co-cultivo e regeneração de plântulas, Enriquez-Obregon et al. (1998) obtiveram uma frequência de transformação relativamente alta na variedade comercial

Ja60-5, com aproximadamente 35% dos tecidos meristemáticos co-cultivados sendo transformados. Estes resultados indicam que ambas a prevenção da morte celular devido às reações de hipersensibilidade induzidas por *Agrobacterium* e o uso de calos jovens regeneráveis como tecido alvo são críticos para alcançar a alta frequência de transformação. Por outro lado, Arencibia et al. (1998) encontraram que a indução da virulência de *A. tumefaciens* em presença de culturas de células de cana, e priorizando as células alvo para organogênese ou embriogênese para o co-cultivo, foram cruciais para o melhoramento do processo de transferência do T-DNA. A transformação de outra variedade comercial de cana, Q117, com a linhagem de *A. tumefaciens* AGL0 usando a proteína verde fluorescente (GFP) como marcador visual, permitiu a seleção das linhagens transgênicas (ELLIOTT; BRETELL; GROF, 1998; ELLIOTT et al., 1999).

Mais recentemente, Manickavasagam et al. (2004) utilizaram gemas axilares como tecido alvo para transformação de cana com alta eficiência com *A. tumefaciens* linhagem EHA105. Eles produziram canas resistentes ao herbicida BASTA em apenas cinco meses com eficiência de transformação próxima de 50%, a maior taxa já relatada para cana-de-açúcar.

Pesquisas voltadas para a geração de metodologias de transformação vegetal devem ser estimuladas. A transformação genética mediada por *A. tumefaciens* também deve ser estudada e aplicada em cana-de-açúcar com maior frequência (ARENCIBIA, 1998; ELLIOTT; BRETELL; GROF, 1998; ENRIQUEZ-OBREGON et al., 1998; ELLIOTT et al., 1999; MANICKAVASAGAM et al., 2004). Com a manipulação e o controle adequados das condições de cultura *in vitro*, considerando a seleção da melhor idade, tipo e estágio da cultura embriogênica, e também o melhoramento da virulência da linhagem de *A. tumefaciens*, tem demonstrado aumentar a eficiência de transformação por este método. A transformação mediada por *A. tumefaciens* apresenta as vantagens de transferir segmentos de DNA relativamente longos com pouco rearranjo, integrar baixo número de cópias do transgene no genoma, ser uma metodologia simples e de baixo custo.

O bombardeamento de micropartículas, também conhecido por biolística, é considerado o principal método de transformação de cana (BIRCH, 1997; MOORE, 1999). Neste método o tecido alvo é bombardeado com os microprojéteis (partículas de tungstênio ou ouro) cobertos de DNA o qual posteriormente poderá ser integrado ao genoma da planta. Pesquisas realizadas com transformação via biolística por Franks e Birch (1991), na Austrália, levaram ao desenvolvimento das primeiras canas transgênicas de uma variedade comercial (BOWER; BIRCH, 1992).

Subsequentemente, a transformação por biolística de muitos genótipos de cana cultivados comercialmente foi relatada de vários laboratórios do mundo (BIRCH; MARETZKI, 1993; BOWER et al., 1996; BIRCH, 1997; IRVINE; MIRKOV, 1997; JOYCE et al., 1998a, b; MOORE, 1999; NUTT et al., 1999). Existem duas tecnologias principais dirigindo o desenvolvimento dos métodos mediados por biolística para transformação da cana: (1) a disponibilidade do equipamento requerido para a transformação, e (2) a capacidade para produzir sistemas de embriogênese somática de vários genótipos de cana. Entre os diferentes tecidos testados, os calos embriogênicos parecem os alvos preferidos devido a sua alta taxa de transformação e regeneração. Por outro lado, a suspensão celular regenerável (FRANKS; BIRCH, 1991; CHOWDHURY; VASIL, 1992), meristemas apicais (GAMBLEY; FORD; SMITH, 1993), discos foliares imaturos e inflorescência (ELLIOTT et al., 2002; LAKSHMANAN et al., 2003) foram usados para a transformação de cana por biolística.

Diversas características foram incorporadas em variedades de cana-de-açúcar, pela inserção de diferentes genes via biolística, como resistência ao antibiótico higromicina (ARENCIBIA et al., 1998), resistência à bactéria *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson (ZHANG; XU; BIRCH, 1999); resistência aos herbicidas glufosinato de amônio (GALLO-MEAGHER; IRVINE, 1996; LEIBBRANDT; SNYMAN, 2003) e fosfinotricina acetiltransferase - gene *bar* (FALCO; TULMANN NETO; ULIAN, 2000); resistência aos vírus *Sugarcane mosaic virus* (JOYCE et al., 1998a), *Sorghum mosaic virus* (INGELBRECHT; IRVINE; MIRKOV, 1999), vírus do amarelecimento da cana-de-açúcar (SCYLV) (RANGEL et al., 2003) e vírus da doença de Fiji (FDV) (McQUALTER et al., 2004); resistência aos insetos-praga *Diatraea saccharalis* F. (ARENCIBIA et al., 1997; BRAGA et al., 2003) e *Eoreuma loftini* Dyar (SETAMOU et al., 2002); superexpressão do gene da canacistatina, inibidor de cisteíno-protease para controle de pragas da ordem Coleoptera (RIBEIRO, 2007); expressão dos inibidores de tripsina Kunitz e Bowman-Birk de soja, obtendo uma redução no crescimento, sem mortalidade, das larvas da broca da cana (FALCO; SILVA-FILHO, 2003); superexpressão da enzima polifenol oxidase (VICKERS et al., 2005); expressão do inibidor de proteinase II da batata ou o gene da lectina de *Galanthus nivalis*, obtendo redução do peso das larvas de coleópteros de solo que se alimentam das raízes dessas plantas (NUTT et al., 1999; CHEN et al., 2004; NUTT, 2005), entre outros.

Além de produzir bons produtos agrícolas, a tecnologia de transformação genética oferece também a possibilidade de estudar os milhares de genes de plantas (com funções conhecidas e desconhecidas) que foram identificados pelos inúmeros programas genomas conduzidos em todo o mundo nos últimos anos (DONG et al, 2005). Como regra geral, estes novos genes são silenciados ou superexpressados em plantas modelo, como a *Arabidopsis thaliana* e o tabaco, criando oportunidades para estudar sua função na planta e para produzir novos fenótipos, impossíveis de serem obtidos através do melhoramento convencional (GALUN, 2005; MULLERR, 2006). Estes estudos podem ser estendidos para culturas de importância econômica como a cana-de-açúcar, abrindo expectativas quanto à resposta da cultura quando um gene, anteriormente estudado em planta modelo, é silenciado ou superexpressado, ou então, a inserção heteróloga de um gene da planta modelo no genoma de cana-de-açúcar.

Neste contexto, a transformação genética pode ser empregada nos programas de melhoramento de cana-de-açúcar para inserção de transgenes visando à obtenção de variedades tolerantes a diferentes estresses bióticos e abióticos que induzem perturbações metabólicas e ativam o processo de morte celular programada. Os estresses abióticos e bióticos afetam de maneira negativa o crescimento, metabolismo e produtividade das plantas, podendo induzir a morte celular programada (WATANABE; LAM, 2008). A identificação e caracterização molecular de genes agronomicamente interessantes relacionados aos mecanismos de estresse e de morte celular programada são importantes desafios para a genômica funcional.

2.3 Estresses Abiótico e Biótico

Estresse é geralmente entendido como qualquer fator que promove uma situação desvantajosa para o organismo (NOGUEIRA, 2004). Em muitos casos, o nível do estresse é medido em termos de sobrevivência do organismo, acúmulo de biomassa, e, no caso de plantas, alterações em processos relacionados diretamente com o crescimento vegetal, tais como a absorção de CO₂ e de minerais (TAIZ; ZEIGER, 2004). Além disso, o conceito de estresse está intimamente relacionado a outro conceito, o de tolerância ao estresse, o qual é definido como a capacidade de aclimação da planta às condições desfavoráveis (TAIZ; ZEIGER, 2004).

O conhecimento da resposta da cana-de-açúcar aos estresses abióticos como seca, frio, salinidade, baixas e altas temperaturas, inundação, poluentes, radiação e baixos teores de fósforo no solo podem fornecer estrutura para melhorar a produção desta cultura utilizando ferramentas

biotecnológicas, o que auxilia no desenvolvimento de variedades mais bem adaptadas a áreas específicas (MENOSSI et al., 2008). A obtenção de variedades de cana tolerantes a estes estresses é cada vez mais importante para os países que pretendem expandir suas plantações. No Brasil, a expansão ocorreu predominantemente nas áreas de pastagens e foi possível devido ao aumento no uso da irrigação e às novas variedades adaptadas ao clima e solo das regiões.

Entre os estresses abióticos, o déficit de água é o principal, e a escassez de água tem sido observada em todo o mundo. A agricultura irrigada é uma das atividades humanas que mais demandam água. No caso da cana, as fronteiras agrícolas estão expandindo, em parte, em áreas em que a irrigação é necessária (MACEDO, 2005; CONAB, 2009). Assim, os efeitos do estresse hídrico nas plantas incluem redução nas taxas de assimilação de CO₂, tamanho das células foliares, taxa de transpiração, potencial de água na planta, taxa de crescimento e abertura estomática (HSIAO, 1973; TAIZ; ZEIGER, 2004). Além disso, o déficit hídrico influencia de maneira direta o crescimento dos perfilhos e a altura final dos colmos e, conseqüentemente, a produção de açúcar (GASCHO; SHIH, 1983, SUGIHARTO, 2004).

Plantas de cana-de-açúcar necessitam de umidade disponível no solo durante todo o período de crescimento; durante a maturação, porém, o ideal é que haja redução na disponibilidade de água, não drasticamente, mas o suficiente para reduzir o crescimento e induzir a maior concentração de açúcar nos colmos (BARBIERI; VILLA NOVA, 1977, BULL, 2000).

Embora pareça surpreendente outro importante estresse no caso da cana é o estresse ao frio, causado por temperaturas abaixo de 0°C (congelamento) ou temperaturas baixas acima de 0°C (refrigeração). O estresse ao frio é incomum em áreas tropicais, onde a cana é mais cultivada, mas ocasionalmente o frio pode afetar severamente a cultura nessas regiões. Isto ocorre porque muitas plantas nos trópicos não desenvolveram estratégias para evitar as conseqüências devastadoras do frio nas células (THOMASHOW, 2001), sugerindo a presença de alelos que podem ajudar esta cultura tropical a lidar com este estresse. Estes genes podem ter um bom potencial nos programas de melhoramento e também na engenharia genética de cana com maior tolerância ao frio, uma característica muito importante que permitiria o cultivo desta cultura em climas temperados.

As plantas enfrentam várias restrições em seu ambiente e têm desenvolvido um grande número de estratégias para evitar ou lidar com a condição de estresse. Com relação aos estresses bióticos, as plantas desenvolveram mecanismos de defesa complexos e variados, incluindo

barreiras químicas e físicas para reduzir os danos causados por insetos herbívoros, nematóides, e infestações por fungo, bactéria e vírus.

O elaborado sistema de defesa e adaptação das plantas pode atuar de três formas. A primeira, a resistência constitutiva, ocorre mesmo sem a ação de agentes agressores: recebida por herança dos ancestrais, ela torna as plantas imunes (ou não-hospedeiras) à maioria dos patógenos. As outras formas são a resistência localizada, ativada no ponto onde ocorre agressão, e a resistência sistêmica adquirida que protege a planta contra ataques subsequentes (RYALS; UKNES; WARD, 1994).

Os mecanismos de resistência são ativados perto da área infectada para tentar prevenir a difusão do patógeno ou deter a contínua predação por insetos. A velocidade com que a planta reconhece a presença do agressor determina o tempo de resposta à invasão, desencadeando uma ou mais reações de defesa. Se a resposta é mais rápida do que o processo de infecção, a planta pode conter o agente (resistência). A interação entre um patógeno e um vegetal é dita 'compatível' quando leva à doença, mas se a planta resiste à agressão a interação é dita 'incompatível' (MARGIS-PINHEIRO et al., 1999).

A resistência local pode ser reconhecida pela chamada reação de hipersensibilidade (*hypersensitive reaction*, ou HR), com a morte de células situadas nos locais por onde o agressor penetra no vegetal. Com isso, a planta impede o acesso do patógeno a células vizinhas, limitando a infecção. Embora essa reação tenha sido identificada há muito tempo, não está claro se sua característica primária (morte celular) tem alguma função direta na resistência ou é consequência de mecanismos de sinalização que de fato levariam aos eventos capazes de inibir a ação do patógeno (MARGIS-PINHEIRO et al., 1999).

Comuns a todas as plantas e a diferentes patógenos, os aspectos fisiológicos da HR incluem o aumento rápido e transitório de agentes oxidantes, a perda de íons potássio (K^+) e ganho de íons hidrogênio (H^+) pelas células, a destruição de compartimentos e o espessamento das paredes celulares e da cutícula (fina camada sobre a epiderme do caule e das folhas), além da síntese de toxinas (fitoalexinas) e proteínas relacionadas à defesa (conhecidas como proteínas PR, de *pathogenesis related*) (MARGIS-PINHEIRO et al., 1999).

Já a resistência sistêmica adquirida conhecida como SAR (de *systemic acquired resistance*) protege a planta, junto com a resistência local, contra novos ataques de um mesmo patógeno. Induzida por diferentes agentes, após uma primeira infecção, a SAR torna a planta

resistente, por várias semanas, a infecções posteriores. A proteção é eficaz contra um grupo de patógenos, e não todos, e varia de acordo com a espécie vegetal (RYALS; UKNES; WARD, 1994).

Algumas características da morte celular programada (MCP) vegetal, incluindo HR, assemelham-se ao mecanismo de morte celular em mamíferos, a apoptose. Assim, na MCP vegetal: (1) a atividade protease como caspase é observada durante a HR induzida pelo vírus do mosaico do tabaco (TMV) (CHICHKOVA et al., 2004); (2) a enzima de processamento vacuolar tem atividade caspase-1 e medeia HR induzida por TMV em tabaco (*Nicotiana benthamiana*) (HARA-NISHIMURA et al., 2005; HATSUGAI et al., 2006); (3) ocorre a liberação de citocromo c, marcação do DNA e mudança nos padrões de fosforilação de proteínas (KRISHNAMURTHY et al., 2000; HOEBERICHTS; WOLTERING, 2003).

2.4 Morte Celular Programada

A morte celular programada (MCP) é geneticamente definida como um processo associado a características morfológicas e bioquímicas distintas que envolvem vias de sinalização controlando a destruição das células com o mínimo dano às células vizinhas (STELLER, 1995; PALLAVAN-UNSAI; BUYUKTUNCER; TUFEKCI, 2005). Este processo é parte integral do ciclo celular de organismos multicelulares (GREENBERG, 1996) e pode ser induzido por vários estímulos ambientais ou de desenvolvimento do organismo (VAUX, 1993; WERTZ; HANLEY, 1996), ocorrendo em plantas durante os processos de desenvolvimento, tais como senescência, embriogênese, desenvolvimento do tecido vascular e durante o processo de interação da planta com um patógeno (PENNEL; LAMB, 1997; DANON et al., 2000).

A ativação ou não do mecanismo destrutivo das células pela planta é determinada pela informação que ela recebe das inúmeras fontes, incluindo ambiental, sinais de desenvolvimento e avaliação das condições metabólicas (WILLIAMS et al., 1992). A célula deve analisar estes diferentes fatores externo e interno e agir sobre eles permanecendo como ela é, ou através da diferenciação, divisão ou morte (Figura 1) (REAPE; McCABE, 2008).

Figura 1 - O destino da célula é determinado por uma variedade de fatores externo e interno (ou sua ausência).
(Figura adaptada de WILLIAMS et al., 1992)

Alguns exemplos de estímulos bióticos e abióticos que ativam o mecanismo de morte em células de plantas e animais são: ataque de patógenos, H_2O_2 , ácido salicílico, falta ou excesso de água, calor e frio. As respostas celulares a estes estímulos podem ser a disfunção mitocondrial, condensação da cromatina, fragmentação do DNA nuclear, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), e ativação de proteases específicas como caspases (GILCHRIST, 1998; BEERS; LAM; KATO; LAWTON, 2001; McDOWELL, 2001; JIN; REED, 2002; HOEBERICHTS; WOLTERING, 2003; LAM, 2004; MADEO et al., 2004). Estes sintomas são expressos diferencialmente, dependendo do propósito de controle da morte celular que ocorre nas células das plantas (LAM, 2004).

A apoptose ou MCP faz parte do desenvolvimento normal e homeostase em metazoários, tendo o termo apoptose comumente empregado para eles. A apoptose é co-regulada pela família de proteínas Bcl-2 que é muito grande e conservada, apresentando proteínas que agem como ativadoras (pró-apoptóticas: Bax, Bak, Bcl-XS, Bid, Bik, Hrk e Bok) ou supressoras (anti-apoptóticas: Bcl-2, Bcl-W, Bfl-1, A1, Mcl-1 e Bcl-X_L) da morte celular em animais por meio de disfunção mitocondrial (GROSS; McDONNELL; KORSMEYER, 1999; JIN; REED, 2002). Membros da família Bcl-2 funcionam principalmente na mitocôndria, e são fundamentais para decidir o destino de uma célula (GROSS; McDONNELL; KORSMEYER, 1999).

A morte programada é comumente distinguida da morte necrótica, embora essas formas de morte sejam consideradas como dois extremos do mesmo fenômeno, chamado “necroapoptose” (LEMASTERS, 1999; PALLAVAN-UNSAL; BUYUKTUNCER; TUFEKCI, 2005). Pelo menos em células animais, o balanço vida ou morte é controlado por um delicado equilíbrio entre fatores anti e pró-apoptóticos. Assim, o principal papel é designado por proteínas da família Bcl-2 (TSUJIMOTO; SHIMUZU, 2000).

A morte celular pode ser dividida em três fases: iniciação, decisão e degradação (KROEMER; REED, 2000). Durante a primeira fase as células acumulam moléculas efetoras, as quais diretamente e seletivamente alteram a permeabilidade da membrana das mitocôndrias. Isto determina a liberação de fatores apoptóticos que disparam a fase de degradação. A última fase implica na ativação de proteases específicas e depois endonucleases as quais são responsáveis pelo típico produto de degradação na MCP. A decisão da célula em morrer por apoptose ou necrose depende das condições em que ela se encontra, sendo que a concentração de ATP e a integridade da mitocôndria são essenciais para isto (ORRENIUS; ZHIVOTOVSKY; NICOTERA, 2003).

Existem evidências que sugerem que os mecanismos de sinalização da morte celular em eucariotos são conservados (TAKABATAKE et al., 2007), assim como os mecanismos de MCP que sucedem as etapas de Bcl-2/Bax/CED9. Reguladores apoptóticos como àqueles da família Bcl-2 (Bax e CED9) de animais podem induzir ou suprimir a morte celular em plantas transgênicas (LACOMME; SANTA CRUZ, 1999; MITSUHARA et al., 1999; DICKMAN et al., 2001; XU; ROGERS; ROOSSINCK, 2004). Em adição, o Bax de mamíferos é capaz de induzir a morte celular em levedura (*Saccharomyces cerevisiae*; ZHA et al., 1996) e também em células vegetais (LACOMME; SANTA CRUZ, 1999). Entretanto, a anotação das sequências de nucleotídeos de plantas e fungos não revelou genes preditos com sequências homólogas aos componentes centrais do mecanismo apoptótico (BEERS; McDOWELL, 2001; KOONIN; ARAVIND, 2002; HOEBERICHTS; WOLTERING, 2003; LAM, 2004; MADEO et al., 2004; WATANABE; LAM, 2004). A aparente inexistência de componentes conservados da morte celular colocou em questão a existência de alguns reguladores centrais dos mecanismos de MCP em plantas e fungos comuns àqueles de metazoários.

O gene *Inibidor Bax-1 (BI-1)* foi primeiramente identificado em bibliotecas de cDNA de humanos como um supressor da morte celular induzida pela proteína pró-apoptótica Bax em

levedura (XU; REED, 1998). Embora nenhum homólogo das proteínas da família Bcl-2, incluindo Bax, tenha sido identificada em plantas, a proteína BI-1 é muito conservada não apenas em animais, mas também em plantas e leveduras. A superexpressão de *BI-1* resultou na proteção contra apoptose induzida por certos tipos de estímulo em células de mamíferos, ao passo que a baixa regulação de *BI-1* pela construção antisense promoveu apoptose de algumas linhagens de tumor (XU; REED, 1998). Subsequentemente, os homólogos de *BI-1* de muitas espécies de plantas incluindo *Arabidopsis*, tabaco, nabo, cevada, canola, couve e arroz foram clonados e caracterizados (KAWAI et al., 1999; SANCHEZ; TORRES ZEBALA; GRANT, 2000; KAWAI-YAMADA et al., 2001; BOLDUC; BRISSON, 2002; BOLDUC et al., 2003; HÜCKELHOVEN; DECHERT; KOGEL, 2003; MATSUMURA et al., 2003; COUPE et al., 2004; EICHMANN et al., 2004; KAWAI-YAMADA; OHMORI; UCHIMIYA, 2004). É intrigante que, no entanto, nenhum gene para moléculas do tipo Bax, considerado pró-apoptótico e alvo da ação de *BI-1*, foi encontrado no genoma de plantas. Adicionalmente, no programa de suicídio de plantas operam proteínas semelhantes as caspases canônicas, denominadas *caspase-like proteases* (CLPs), como amplificadoras da cascata de sinalização e determinantes finais da MCP, mais uma vez realçando a proximidade evolutiva dos programas de morte.

De fato, a compreensão das relações entre possíveis reguladores centrais da MCP como as CLPs parece ser um item importante, ainda a ser esclarecido, na evolução dos eucariotos. Ainda que pouco seja conhecido a respeito das moléculas-chave, especialmente em plantas, a identificação das mesmas pode ter aplicações relevantes no campo de resistência a doenças e aos estresses abióticos, uma vez que a morte celular é um tipo de resposta comum a situações adversas variadas.

O mecanismo de morte celular em mamíferos, a apoptose (Figura 2), inicia quando um sinal de morte ativa a ação da proteína Bax que transloca para a mitocôndria e promove a liberação do citocromo c dos espaços intermembranares da mitocôndria para o citosol. Este citocromo c está então disponível para se associar com Apaf-1 seguindo a ativação de caspases, uma família de protease que induz as mudanças apoptóticas como condensação de cromatina e marcação do DNA. Neste contexto a proteína BI-1, reguladora negativa da morte celular, pode agir inativando a ação da proteína Bax, suprimindo a apoptose ou MCP (Figura 2). As famílias Bcl-2 e caspase são muito conservadas no reino animal, mas não há homólogos óbvios nos genomas de leveduras e plantas. No entanto, a expressão de Bax de mamífero em leveduras e

2004; KAWAI-YAMADA; OHMORI; UCHIMIYA, 2004). AtBI-1 é uma proteína citoprotetora de aproximadamente 27 kDa, com 6 domínios transmembrana potenciais, e um domínio C-terminal altamente conservado que contém uma região de ligação para calmodulina, afetando a homeostase de cálcio na regulação da morte celular (KAWAI-YAMADA; OHMORI; UCHIMIYA, 2004; IHARA-OHORI et al., 2007). Esta proteína está principalmente localizada na membrana do retículo endoplasmático (RE) (XU; REED, 1998; LAM; KATO; LAWTON, 2001; BOLDUC et al., 2003; HÜCKELHOVEN; DECHERT; KOGEL, 2003; EICHMANN et al., 2004; KAWAI-YAMADA; OHMORI; UCHIMIYA, 2004). O gene *BI-1* de planta é expresso em vários tecidos e seu nível de expressão é aumentado durante a senescência e sob vários tipos de estresses bióticos e abióticos (SANCHEZ; TORRES ZEBALA; GRANT, 2000; MATSUMURA et al., 2003; BOLDUC et al., 2003; HÜCKELHOVEN; DECHERT; KOGEL, 2003; KAWAI-YAMADA; OHMORI; UCHIMIYA, 2004).

O RE é o primeiro compartimento da via secretora de eucariotos, sendo responsável pela síntese e modificação de proteínas. Imediatamente após a entrada nessa organela, os polipeptídeos nascentes podem sofrer uma série de processamentos pós-traducionais. Estes incluem adição covalente de carboidratos e clivagem por enzimas proteolíticas, enovelamento nas estruturas secundárias e terciárias apropriadas, as quais podem ser estabilizadas por ligações dissulfídicas e, em alguns casos, aquisição de estruturas quaternárias em complexos multiméricos (YANJUN; HENDERSHOT, 2004). O RE também possui um mecanismo de controle de qualidade que discrimina proteínas corretamente das incorretamente enoveladas. Este mecanismo assegura que somente proteínas corretamente enoveladas e montadas prossigam para seu destino final (ODA et al., 2003; SITIA; BRAAKMAN, 2003).

O acúmulo de proteínas mal dobradas é a principal causa de estresse no RE, e pode ser resultado do rápido influxo de polipeptídios mal dobrados nascentes, excedendo a capacidade de dobramento, ou quando se tem um impedimento para o correto dobramento das proteínas, como a prevenção de modificações pós-traducionais, o desequilíbrio de cálcio ou o erro na estrutura primária da proteína (RON; WALTER, 2007). Estas perturbações podem afetar e acionar a via de sinalização denominada via de resposta a proteínas mal dobradas no RE (UPR), que é uma via de transdução de sinal que ativa a transcrição coordenada de um conjunto de genes envolvidos no restabelecimento da homeostasia no RE, tanto pelo aumento da capacidade de dobramento das proteínas como pelo decréscimo da demanda destes dobramentos (COSTA, 2007).

Para aumentar a capacidade de dobramento, a síntese de chaperonas no RE é aumentada (KOZUTSUMI et al., 1988). Por outro lado, a demanda de dobramento diminui pela (1) diminuição global da síntese de proteínas, (2) diminuição da transcrição de genes codificando proteínas secretórias, (3) degradação de mRNAs específicos (HOLLIEN; WEISSMAN, 2006) e (4) grande liberação de proteínas mal e não dobradas através da degradação associada ao RE (TRAVERS et al., 2000).

O RE de plantas é diferente do RE de animais, sendo contínuo ao longo da planta por via das cadeias de plasmodesmas que permitem a comunicação célula-a-célula (GHOSHIROY et al., 1997). Certos sinais de tensão, como o ataque por um patógeno, são transmitidos ao longo da planta, ocasionando uma indução sistemática de genes específicos por esta continuidade do RE. Porém, a UPR é restringida às células onde a tensão foi iniciada não induzindo uma resposta sistêmica na planta (JELITTO-VAN DOOREN; VIDAL; DENECKE, 1999).

Análises recentes do transcriptoma de *A. thaliana* induzido por estresse no RE evidenciaram a indução de genes envolvidos em diferentes processos como o dobramento de proteínas, glicosilação/modificação, translocação, degradação de proteínas, tradução, tráfego de vesículas, morte celular programada, quinases, fatores de transcrição, proteínas de estresse e proteínas não classificadas, sendo que muitas são ortólogas a proteínas da UPR de mamíferos e leveduras (COSTA, 2007).

A expressão de *AtBI-1*, presente na membrana do RE, é rapidamente regulada em plantas durante fermento ou ataque de patógeno (SANCHEZ; TORRES ZEBALA; GRANT, 2000) e apresenta baixa regulação durante a resposta de hipersensibilidade induzida por elicitor (HR) (MATSUOKA et al., 2003). A superexpressão deste gene suprime a morte celular induzida por H₂O₂, ácido salicílico, elicitor, calor e frio em células de plantas, sugerindo que *AtBI-1* apresenta papel importante em resposta a vários estresses ambientais. Entretanto, o mecanismo de supressão da morte celular mediada por *AtBI-1* não foi elucidado.

Muitas pesquisas foram desenvolvidas para esclarecer o mecanismo de regulação e o modo de ação do gene *AtBI-1* e dos homólogos de *BI-1* de levedura, mamíferos e outras plantas. A superexpressão de *BI-1* de planta mostrou suprimir a morte celular induzida por Bax ou estresse abiótico em uma variedade de células de levedura, planta e mamíferos (BOLDUC et al., 2003; CHAE et al., 2003; MATSUMURA et al., 2003; KAWAI-YAMADA et al., 2001; KAWAI-YAMADA; OHMORI; UCHIMIYA, 2004), sugerindo que o mecanismo bioquímico

regulado por *BI-1* é evolutivamente conservado em eucariotos. Os homólogos do gene *BI-1*, isolados de *Arabidopsis thaliana* e arroz suprimiram a MCP induzida por Bax em levedura (KAWAI et al., 1999; SANCHEZ; TORRES ZEBALA; GRANT, 2000) e em *Arabidopsis* (KAWAI-YAMADA et al., 2001), e a co-expressão transitória de *Bax* com homólogos de *BI-1* isolados de canola e tabaco em células de humano revelaram que ambos os homólogos de *BI-1* de planta podem substancialmente inibir a apoptose induzida pela superexpressão de Bax em células de animal (BOLDUC et al., 2003). Em plantas, a baixa regulação do homólogo *NtBI-1* de tabaco usando um RNA antisense resultou em aceleração da morte celular em células de tabaco BY-2 sobre deficiência de carbono (BOLDUC; BRISSON, 2002), sugerindo seu possível envolvimento na morte celular autofágica.

Matsumura et al. (2003) encontraram que a aplicação de um elicitor do fungo *Magnaporthe grisea* a células de arroz cultivadas causa a baixa regulação da expressão de *OsBI-1* (*BI-1* de arroz) com progressão concomitante da morte celular. Ao contrário, células transgênicas de arroz expressando o gene *AtBI-1* mostraram sustentadas células de sobrevivência quando desafiadas com o elicitor do fungo, sugerindo que a expressão de *BI-1* é um dos pontos de regulação da morte celular mediada por elicitor em culturas de células de arroz. Em contraste, em folhas de *Arabidopsis*, cevada e arroz, a morte celular ocorreu na área onde o patógeno foi inoculado. É possível que a expressão de *BI-1* possa, de fato, ser suprimida no local inicial de ataque do patógeno, levando a ativação da morte celular. Subsequentemente, entretanto, a expressão de *BI-1* poderia ser induzida no local que circunda as lesões para restringir a disseminação de morte celular em cevada (HÜCKELHOVEN et al., 2001; SANCHEZ; TORRES ZEBALA; GRANT, 2000).

A proteína Mlo de cevada (*Hordeum vulgare*), uma proteína da membrana plasmática específica de planta, é conhecida como um modulador de defesa celular e morte celular (PIFFANELLI et al., 2002). A superexpressão de *HvBI-1* de cevada em um cultivar *mlo5* mostrou recuperar a função Mlo quando penetradas pelo patógeno *Blumeria graminis* (HÜCKELHOVEN; DECHERT; KOGEL, 2003), sugerindo que *BI-1* e Mlo provavelmente possuem funções similares na defesa celular e modulação da morte celular. Além disso, foi demonstrado que a proteína de cevada Mlo se liga a calmodulina e a interação está relacionada com o controle de sua função (KIM et al., 2002). A calmodulina facilita a resposta dependente de Ca^{2+} através da ligação de suas proteínas alvo e modulação de suas atividades. Ihara-Ohori et al.

(2007) mostraram que AtBI-1 pode também interagir com calmodulina e as atividades de supressão da morte celular por AtBI-1 em células vegetais são mediadas, pelo menos em parte, pela modulação de homeostase de íon. Em outro estudo, HvBI-1 mostrou atenuar a invasão e proliferação do fungo endofítico de raiz *Piriformospora indica*, o qual depende da célula hospedeira para haver patogenicidade (DESHMUKH et al., 2006).

Para testar o potencial de expressão ectópica de *BI-1* nas interações entre fungo e plantas cultivadas, Babaeizad et al. (2009) produziram plantas de cevada transgênicas estáveis expressando GFP fusionada ao *HvBI-1* sob controle do promotor *CaMV35S*. Estas plantas eram férteis e não apresentavam evidências de alterações de desenvolvimento quando comparadas com os parentais selvagens. Também, elas eram mais resistentes à morte celular induzida por Bax pró-apoptótico, entretanto mais suscetíveis ao fungo biotrófico *Bgh*. Observações microscópicas da interação da planta transgênica com o fungo revelaram que a intensificação da suscetibilidade e o maior grau de estabelecimento do fungo nas células epidérmicas estava associado com uma frequência reduzida de reações de hipersensibilidade a morte celular. Em contraste, plântulas jovens de cevada transgênicas eram mais resistentes ao fungo *Fusarium graminearum* do que as plantas selvagens. Assim, o efeito de GFP-HvBI-1 sobre o resultado da interação planta-fungo pareceu depender do estilo de vida do patógeno.

Avaliando os efeitos de citocininas (CKs) na expressão de *NtBI-1* em células em suspensão de *Nicotiana tabacum*, via análise de *Western*, Bolduc et al. (2007) encontraram que a proteína NtBI-1 é altamente regulada seguindo tratamentos com CKs em concentrações que induzem uma resposta ao estresse (determinada pela redução no crescimento), mas não em concentrações de indução da morte celular programada. Estes dados indicam que *NtBI-1* é induzido em resposta ao estresse causado por CKs.

Kawai-Yamada et al. (2005) utilizaram o gene *AtBI-1* controlado pelo promotor GAL1 como um supressor da MCP em levedura, e isolaram um fator de defeito no crescimento celular (*cell growth defect factor-1*, *Cdf1*) da biblioteca de *A. thaliana*. A superexpressão de *Cdf1* causou a MCP em levedura, considerando que tal efeito foi suprimido pela co-expressão de *AtBI-1*.

Em outro estudo, Nagano et al. (2009) identificaram um citocromo *b5* (Cb5) de *Arabidopsis* (AtCb5) como um intermediário de *AtBI-1* na biblioteca de cDNA de *Arabidopsis*. Cb5 é uma proteína de transferência de elétrons principalmente na membrana do RE. Em adição, a análise de Complementação de Fluorescência Bimolecular (BiFC) e análise de Transferência de

Energia por Ressonância Fluorescente (FRET) confirmaram que *AtBI-1* interage com AtCb5 em plantas. Por outro lado, estes pesquisadores encontraram que a supressão mediada por *AtBI-1* da morte celular em levedura requer um ácido graxo hidroxilase-1 de *Saccharomyces cerevisiae* (ScFAH1), que tem um domínio como Cb5 no N-terminal o qual interagiu com AtBI-1.

A proteína AtBI-1 preveniu a perda de íons, mas não a geração de ROS, quando o seu gene foi superexpresso junto com Bax em *Arabidopsis* (KAWAI-YAMADA; OHMORI; UCHIMIYA, 2004). Em adição, a morte celular induzida por H₂O₂, ácido salicílico, elicitor, calor e frio foi suprimida em células vegetais superexpressando *AtBI-1* (CHAE et al., 2003; MATSUMURA et al., 2003; KAWAI-YAMADA; OHMORI; UCHIMIYA, 2004).

Para estudar o gene *AtBI-1*, Watanabe e Lam (2006) identificaram e caracterizaram dois mutantes com inserção de T-DNA neste gene. Estes pesquisadores forneceram evidências genéticas de que BI-1 modula a progressão da morte celular desencadeada por ambos os tipos de sinais biótico e abiótico de morte celular em *Arabidopsis*. Além disso, eles mostraram que a proteína AtBI-1 não é essencial para o crescimento e desenvolvimento vegetativo normal em plantas de *Arabidopsis*, sugerindo sua função especializada em plantas sob condições de estresse.

Em 2008, os pesquisadores Watanabe e Lam descreveram o efeito de um antibiótico chamado tunicamicina na indução do estresse no RE em plântulas de *Arabidopsis*. Eles apresentaram evidências quanto às funções do *AtBI-1* como um modulador da MCP mediado por estresse no RE. O tratamento de plântulas de *Arabidopsis* com tunicamicina (TM), um inibidor da N-glicosilação e indutor do estresse no RE acionando o acúmulo de proteínas mal dobradas no RE, resulta na forte inibição do desenvolvimento das raízes e perda de sobrevivência acompanhada por características típicas da MCP tais como acúmulo de H₂O₂, condensação de cromatina, e fragmentação oligonucleosomal do DNA nuclear. Estes fenótipos foram atenuados por co-tratamento com dois diferentes químicos chaperonas, sódio 4-fenilbutirato e ácido tauroursodeoxicólico, ambos com propriedades chaperona que podem reduzir o carregamento de proteínas mal dobradas no RE. A expressão do mRNA de *AtBI-1* e sua atividade promotora foram aumentadas dramaticamente antes do início da morte celular induzida por TM. Comparado com as plantas controle, dois mutantes para o gene *AtBI-1* (*atbi1-1* e *atbi1-2*) exibiram hipersensibilidade ao TM com acelerada progressão da MCP. Inversamente, a superexpressão de *AtBI-1* reduziu a sensibilidade das plântulas de *Arabidopsis* ao TM. Entretanto, alterações nos níveis de expressão do gene *AtBI-1* não causam um efeito significativo nos modelos de expressão

de genes típicos que são induzidos por estresse no RE (*AtBip2*, *AtPDI*, *AtCRT1*, e *AtCNX1*). Watanabe e Lam (2008) propuseram que *AtBI-1* desempenha um papel fundamental como um fator altamente conservado de sobrevivência durante o estresse no RE que atua em paralelo com o mecanismo de resposta a proteínas mal dobradas.

A glicosilação de proteínas para formar glicoproteínas é importante por duas razões. Altera as propriedades das proteínas, modificando sua estabilidade, solubilidade e volume físico. Além disso, os carboidratos em glicoproteínas atuam como sinais de reconhecimento, que são centrais para aspectos de direcionamento de proteínas e para o reconhecimento celular de proteínas e de outras células. Os dois tipos de glicosilação mais comuns são: a N-glicosilação e a O-glicosilação. No processo da N-glicosilação as proteínas têm os açúcares ligados à proteína através do nitrogênio da amida de resíduos de asparagina. Esse processo é concomitante a tradução, isto é, ocorre enquanto a proteína está sendo sintetizada, podendo afetar o enovelamento da proteína.

Visando a obtenção de informações sobre o mecanismo da morte celular programada em plantas, será de grande importância a transformação genética de cana-de-açúcar para expressão heteróloga do cDNA de *AtBI-1*, juntamente com o estudo da expressão do transgene e bioensaio com o indutor de estresse no retículo endoplasmático, o antibiótico tunicamicina. A seleção de plantas transgênicas de cana expressando o cDNA de *AtBI-1* poderá ser uma alternativa para reduzir as perdas causadas por estresses como ataque de patógenos, seca, salinidade e frio, possibilitando a supressão da morte celular programada.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As atividades referentes a presente Tese foram desenvolvidas no Laboratório de Biologia Molecular e Genômica, CEBTEC, do Departamento de Ciências Biológicas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

3.1 Material vegetal

Para a realização deste trabalho, selecionou-se a variedade de cana-de-açúcar RB835089 que foi gentilmente cedida pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Esta variedade se destaca pela alta produtividade agrícola, ampla adaptabilidade e estabilidade. Sua maturação é considerada tardia (pico de maturação em agosto e setembro) e o teor de sacarose no colmo é médio (entre 15 a 16,5 toneladas de pol por hectare). Apresenta um ótimo comportamento *in vitro*, produzindo calos embriogênicos em grande quantidade (Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar conduzido pelo Centro de Ciências Agrárias – UFSCar; acesso na *homepage* <http://pmgca.dbv.cca.ufscar.br>).

3.1.1 Obtenção de calos

Plantas de cana-de-açúcar da variedade RB835089, com idade variando de 8 a 10 meses foram utilizadas para retirada dos explantes utilizados nos experimentos *in vitro*. A região da planta utilizada para indução de calos é a porção apical (aproximadamente 30 cm) que contém o meristema apical caulinar protegido por folhas jovens enroladas, denominada de palmito.

As etapas da metodologia utilizada para obtenção de calos embriogênicos da variedade RB835089 *in vitro* estão na Figura 3. Ao chegar do campo, os palmitos (Figura 3A) foram submetidos à assepsia, iniciando com a lavagem em água corrente e retirada das folhas mais externas (duas a três folhas). Em seguida, um segmento de aproximadamente 10 cm foi selecionado (Figura 3B) e realizou-se a esterilização superficial com etanol absoluto por 1 minuto sob agitação, e posteriormente com solução de hipoclorito de sódio 30% por 15 minutos também sob agitação (Figura 3C). Em condições assépticas (fluxo laminar), foram feitas três lavagens com ddH₂O (água destilada, deionizada e autoclavada) e a folha externa do palmito foi retirada. As folhas jovens restantes, que envolvem a região meristemática, foram transversalmente seccionadas em segmentos de aproximadamente 2 mm de espessura (Figura 3D e 3E). Estes explantes foram cultivados em meio de cultura denominado MS3AC que é o meio basal MS

(MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 5% de água de coco (v/v), 3 mg.L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 150 mg.L⁻¹ de ácido cítrico, 30 g.L⁻¹ de sacarose e solidificado com 2,3 g.L⁻¹ de Phytigel® (Sigma), pH 5,8. Este material foi incubado em câmara de crescimento no escuro com temperatura de 27±2°C.

Figura 3 – Sequência para obtenção de calos embriogênicos *in vitro*. A: Ponteiros de cana vindos do campo. B: Segmento da parte apical (10 cm) que contém o meristema apical caulinar protegido por folhas jovens enroladas (Palmito). C: Esterilização superficial com etanol absoluto, e posteriormente com solução de hipoclorito de sódio 30% sob agitação. D: Cortes transversais de aproximadamente 2 mm de espessura. E: Disco foliar em meio MS3AC para indução de calos no escuro. F: Calos embriogênicos em meio MS3AC que são selecionados e transferidos para meio fresco em cada subcultivo. G e H: Regeneração de plântulas em meio MSAC (fotoperíodo 16 horas)

A cada três semanas, os explantes eram repicados e transferidos para meio fresco. Nestas condições, os discos de palmito iniciaram a formação de calos, geralmente de dois tipos: (1) calos com aspectos nodulares, compactos, facilmente destacáveis da estrutura original, geralmente embriogênicos (Figura 4A); (2) calos mais friáveis e translúcidos, de comportamento não morfogênico na maioria das vezes (Figura 4B). Na transferência de meio de cultura, realizaram-se as seleções de calos com aspectos pré-embriogênico e embriogênico (Figura 4A).

Figura 4 - Calos da variedade RB835089. (A) Calos com aspecto embriogênico; (B) Calos com aspecto não morfogênico

3.1.2 Teste de regeneração de plântulas da variedade RB835089 *in vitro*

Para avaliar a melhor idade dos calos embriogênicos da variedade em estudo a serem utilizados nos experimentos de transformação genética, realizou-se o ensaio para quantificar o número de calos embriogênicos, obtidos em cada subcultivo, que regeneravam plântulas, associando-se a melhor idade com o maior número em regeneração. As fases de subcultivo avaliadas foram R1, R2, R3, R4 e R5 que representam as quantidades de repiques para meio MS3AC fresco. A cada 25 dias foram feitos os subcultivos de 25 porções de calos embriogênicos selecionados para meio de cultura de regeneração MSAC que é o meio basal MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de 150 mg.L^{-1} de ácido cítrico, 30 g.L^{-1} de sacarose e solidificado com $2,3 \text{ g.L}^{-1}$ de Phytigel® (Sigma), pH 5,8. Este meio de regeneração estava presente em frascos de vidro, contendo os calos que foram incubados em sala de crescimento com temperatura de

27±2°C e fotoperíodo de 16 horas. O experimento foi avaliado após 25 dias através da contagem do número de plântulas obtidas em cada subcultivo R1, R2, R3, R4 e R5 (Figura 3G e 3H).

3.2 Seleção do transgene para transformação genética nuclear de cana-de-açúcar

Neste trabalho, o gene escolhido para a transformação genética de cana-de-açúcar foi o que codifica a proteína *BAX Inhibitor-1* (BI-1: inibidor Bax-1), cujo cDNA foi isolado de *Arabidopsis thaliana* por Sanchez, Torres Zebala e Grant (2000) sendo denominado *AtBI-1*. Esta proteína é homóloga a BI-1 de mamíferos e tem o papel de atenuar a morte celular programada induzida por estresses bióticos e abióticos.

3.2.1 Análise *in silico* da proteína AtBI-1

A proteína AtBI-1 foi analisada *in silico* com o objetivo de conhecer suas características moleculares. A análise foi realizada através da *homepage The Arabidopsis Information Resource* (TAIR, acesso <http://www.arabidopsis.org>) que mantém um banco de dados de *Arabidopsis thaliana*, incluindo a sequência completa do genoma com a estrutura dos genes, informação do produto gênico, metabolismo e expressão gênica. Desta forma, buscou-se o tamanho da proteína AtBI-1 em kDa, a composição dos domínios e a posição dos éxons e íntrons.

3.2.2 Análise filogenética da proteína BI-1

A sequência da proteína AtBI-1 foi avaliada quanto a existência de similaridade com outras sequências de espécies de plantas da família Poaceae através do *tBLASTn* presente no banco de dados TIGR (*The Institute for Genomic Research*, acesso na *homepage* <http://www.tigr.org/db.shtml>). As sequências de aminoácidos das proteínas BI-1 de várias espécies Poaceae e a AtBI-1 de *Arabidopsis thaliana* foram alinhadas utilizando o algoritmo de alinhamento múltiplo CLUSTAL W (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) que é um programa acessório do *software BioEdit Sequence Alignment Editor* (HALL, 1999) (acesso: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). A matriz de alinhamento foi importada para o *software* MEGA4 versão 4.0 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) para análise filogenética (TAMURA et al., 2007). O método selecionado foi o da máxima parcimônia que considera que a mutação *indel* (evento que envolve deleção ou inserção de aminoácido,

verificado através da comparação de cadeias de aminoácidos homólogas com comprimentos diferentes) ocorre com menor frequência do que a mutação do tipo substituição de aminoácidos.

Para testar o grau de confiabilidade da árvore filogenética foi selecionado o teste de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985). A técnica do *bootstrap* revela a consistência interna dos dados, ou seja, se a topologia muda muito conforme a reamostragem dos dados. Este procedimento é usado para verificar a proporção de vezes em que uma determinada estimativa ocorre além de um limite pré-estabelecido através de sorteios repetidos, com reposição, dos dados originais. De acordo com Schneider (2003), considera-se como *bootstrap* significativo (robusto) valores acima de 95%, independente da repetibilidade. Já valores moderados (70 - 94%) ou fracos (51 - 69%), se repetidos com vários marcadores diferentes, poderiam ser considerados como indicativos de suporte para o clado (representação gráfica de um grupo monofilético: grupo constituído de uma espécie ancestral e todos os seus descendentes).

3.3 Transformação genética de cana-de-açúcar via biolística

3.3.1 Construção dos vetores para expressão na planta

Com o objetivo de obter plantas de cana-de-açúcar transformadas com o cDNA do gene *AtBI-1*, que atenua a morte celular programada induzida por estresses biótico e abiótico, fez-se a co-transformação com o gene *neo*, que confere resistência aos antibióticos aminoglicosídicos como por exemplo a geneticina (BOWER; BIRCH, 1992; FITCH; DE LA CRUZ; MOORE, 1995). Este gene está presente no plasmídeo pHA9 (promotor *Ubi-1* :: gene *neo* :: terminador *Nos*) (Figura 5). Para o gene *AtBI-1* foram desenvolvidos os plasmídeos pDM8 e pDM9, que apresentam o cDNA do gene *AtBI-1* sob o controle dos promotores constitutivos *CaMV35S* e *Ubi-1*, respectivamente. O promotor *35S* do vírus do mosaico da couve-flor (*CaMV35S*), embora muito ativo em dicotiledôneas, mostra baixos níveis de expressão dos transgenes na maioria dos estudos de cana relatados (LAKSHMANAN et al., 2005), ao contrário do promotor da ubiquitina do milho (*Ubi-1* CHRISTENSEN; QUAIL, 1996). Segundo Neuteboom et al. (2002), em monocotiledôneas os promotores constitutivos mais utilizados são o da ubiquitina de milho (*Ubi-1*) e o da actina do arroz (*Act1*). Embora estes dois promotores mantenham um padrão de expressão relativamente constante, eles costumam mostrar padrões distintos de expressão em espécies, tipos de células e em condições de cultivo diferentes.

Figura 5 - Esquema representativo do plasmídeo pHA9 que contém o cassete de expressão do gene *neo* que codifica para neomicina fosfotransferase (NPTII) sob o controle do promotor da ubiquitina do milho (*Ubi-1*) e o terminador da nopalina sintetase *T-Nos*. As setas indicam a posição dos *primers nptII* (*Forward*) e *nptII* (*Reverse*). Sítios de restrição: B, *Bam*HI; Bg, *Bgl*II; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; N, *Nae*I; P, *Pst*I; Sa, *Sal*I; Sp, *Sph*I; T, *Tth*I; X, *Xba*I

O vetor de transformação pDM8 (Figura 6) foi construído pela subclonagem do cassete de expressão do cDNA do gene *AtBI-1* (promotor *CaMV35S* :: *AtBI-1-V5His₆* :: terminador *Nos*), isolado do vetor binário pNW166 (gentilmente cedido pelo Dr. Eric Lam, Rutgers University, Department of Plant Biology and Patology, New Jersey, EUA; WATANABE; LAM, 2008), no vetor pUC18. Neste plasmídeo o cDNA *AtBI-1* está fusionado ao *V5-His₆* *tagged* útil para análise de expressão do gene nas plantas transgênicas pela técnica de *Western blot*. O cassete de expressão do *AtBI-1* foi liberado do vetor pNW166 (Figura 7) nos sítios de restrição para as enzimas *Hind*III e *Eco*RI e então subclonado no vetor pUC18 nestes mesmos dois sítios de restrição.

Figura 6 - Esquema representativo do vetor pDM8 com 4585 pb que contém o cassete de expressão do cDNA do gene *AtBI-1* fusionado ao *V5-His₆* *tagged* sob o controle do promotor *CaMV35S* e o terminador da nopalina sintase *T-Nos*. As setas indicam a posição dos *primers CaMV35S* (*Forward*), *Bi* (*Forward*) e *Bi* (*Reverse*)

Figura 7 - Esquema representativo do vetor binário pNW166 que contém o cassete de expressão do gene *neo* que codifica para neomicina fosfotransferase (NPTII) sob o controle do promotor *CaMV35S* e o terminador da nopalina sintetase *T-Nos*. Apresenta o cassete de expressão do cDNA do gene *AtBI-1* fusionado ao *V5-His₆ tagged* sob o controle do promotor *CaMV35S* e o terminador da nopalina sintase *T-Nos*. Sítios de restrição: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; S, *Sac*I; X, *Xba*I. RB: borda direita; LB: borda esquerda

O vetor de transformação pDM9 (Figura 8) foi construído pela substituição da região codificadora do gene *bar* no vetor pAHC20 (cedido pela Dra. Gláucia Souza, Instituto de Química, USP) pela região codificadora do cDNA do gene *AtBI-1* fusionado ao *V5His₆ tagged*, isolado do vetor binário pNW166. A região codificadora *AtBI-1-V5-His₆* de interesse foi isolada do vetor pNW166 pela digestão com as enzimas *Bam*HI e *Sac*I. O vetor pAHC20 (Figura 9) foi digerido com as mesmas enzimas de restrição para eliminação da região codificadora do gene *bar*. Então, realizou-se a subclonagem de *AtBI-1-V5His₆* nos sítios *Bam*HI e *Sac*I do plasmídeo pAHC20, gerando o vetor pDM9, exposto no esquema apresentado na Figura 8.

Figura 8 - Esquema representativo do vetor pDM9 com 5764 pb que contém o cassete de expressão do cDNA do gene *AtBI-1* fusionado ao *V5-His₆ tagged* sob o controle do promotor *Ubi-1* e o terminador da nopalina sintase *T-Nos*. As setas indicam a posição dos primers *Ubi-1* (Forward), *Bi* (Forward) e *Bi* (Reverse)

Figura 9 - Esquema representativo do plasmídeo pAHC20 que contém o cassete de expressão do gene *bar* que codifica para fosfinotricina acetiltransferase (BAR) sob o controle do promotor da ubiquitina do milho (*Ubi-1*) e o terminador da nopalina sintetase *T-Nos*. Sítios de restrição: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; P, *Pst*I; S, *Sac*I; Sa, *Sal*I; Sp, *Sph*I; T, *Tth*I; X, *Xba*I

Os plasmídeos pDM8 e pDM9 foram inseridos em *Escherichia coli* linhagem DH5 α por transformação de células competentes (SAMBROK; FRITSCH; MANIATS, 2001). Midipreps dos plasmídeos foram preparadas com QIAGEN® Plasmid Midi Kit Tip 100 (Cat. No. 12143), conforme especificações do fabricante. Os preparos foram quantificados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio com o marcador *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen).

3.3.2 Sequenciamento do cDNA de *AtBI-1* clonado

O sequenciamento da região codificadora *AtBI-1-V5His₆* dos plasmídeos pDM8 e pDM9 foi realizado para confirmação das clonagens realizadas, garantindo que os insertos foram inseridos corretamente. Para isto, utilizou-se o sequenciador automatizado ABI 3100 (*Applied Biosystems*) com *ET Dye-terminators*, acompanhando os protocolos estabelecidos no Laboratório de Biologia Molecular e Genômica do Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ/USP. O software *Vector NTI Suíte 5.0* foi utilizado para avaliação dos cromatogramas de sequenciamento. Posteriormente as sequências foram avaliadas quanto a existência de similaridade com outras sequências no *GenBank* através do *BLAST/NCBI* (*Basic Local Alignment Search Tool – National Center of Biotechnology Information, USA*) (ALTSCHUL et al., 1990) (acesso na homepage <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/BLAST/>).

3.3.3 Otimização dos parâmetros de bombardeamento

O acelerador de partículas utilizado para o bombardeamento foi o de modelo PDS-1000/He *Biolistic*® *Particle Delivery System* (BIO-RAD).

Para acompanhar a eficiência dos experimentos de bombardeamento quanto à qualidade da precipitação do DNA plasmidial em partículas de tungstênio e otimizar os parâmetros físicos do acelerador de partículas, folhas de fumo com a face abaxial voltada para cima foram posicionadas no centro das placas de Petri contendo meio MSAC sólido, sob papel de filtro autoclavado (Figura 11A), e bombardeadas com o plasmídeo pFF19G (gentilmente cedido pelo Dr. Pal Maliga, Waksman Institute, Rutgers, The State University of New Jersey, EUA; TIMMERMANS et al., 1990). Este plasmídeo contém o gene repórter da β -glucoronidase *uid-A* (GUS) sob o controle do promotor *CaMV35S*. A Figura 10 mostra um esquema representativo do plasmídeo em questão.

Figura 10 - Esquema representativo do plasmídeo pFF19G que contém o cassete de expressão do gene repórter *uid-A* (GUS) sob o controle do promotor *CaMV35S* e o terminador *35S polyA*. Sítios de restrição: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; K, *Kpn*I; N, *Nco*I; P, *Pst*I; S, *Sac*I; Sa, *Sal*I; Sm, *Sma*I; X, *Xba*I

Para a precipitação do plasmídeo na superfície das partículas de tungstênio, utilizou-se o protocolo descrito a seguir:

O DNA plasmidial foi precipitado em partículas de tungstênio M10 de 1,0 μ m (GTE Sylvania Chemicals/Metals) a uma concentração de 4 μ g de DNA por mg de tungstênio. Para assepsia das partículas, 25 mg foram pesadas e lavadas com 500 μ L de etanol absoluto gelado. O tubo de 1,5 mL contendo as partículas foi colocado em agitador por 6 minutos e incubado em banho-maria a 95°C durante 1 hora. Centrifugou-se a 6797 x g por 2 segundos e a fase aquosa foi removida cuidadosamente. Adicionou-se 500 μ L de etanol absoluto gelado e as partículas foram sonicadas em aparelho de ultra-som (*Sonics Vibra Cell*) por 15 minutos com parâmetros de: amplitude 75%; 3 segundos ligado e 1 segundo desligado; temperatura 20°C. Centrifugou-se a 6797 x g por 2 segundos e a solução aquosa foi removida. O precipitado foi lavado três vezes com 500 μ L de ddH₂O (resfriada) e centrifugou-se a 6797 x g por 2 segundos, removendo a

solução aquosa em cada lavagem. Dilui-se o precipitado em 500 µL de ddH₂O (resfriada). Para a precipitação do DNA plasmidial nas partículas de tungstênio, utilizou-se para seis disparos os seguintes componentes adicionados na ordem: 50 µL de suspensão de tungstênio, 10 µg de DNA plasmidial (na co-transformação foram utilizados 5 µg de cada plasmídeo), 50 µL CaCl₂ 2,5 M gelado (-20°C), 20 µL espermidina 0,1 M. Esta suspensão foi incubada em agitador durante 30 minutos a 4°C. Adicionou-se 200 µL de etanol absoluto gelado. Centrifugou-se a 10621 x g durante 1 segundo e a fase aquosa foi retirada. O precipitado foi ressuspensionado em 200 µL de etanol absoluto gelado. Centrifugou-se a 10621 x g durante 1 segundo e a fase aquosa foi retirada. Esta etapa de lavagem do precipitado foi repetida por três vezes. O precipitado foi diluído com 30 µL de etanol absoluto gelado. Alíquotas de 5 µL de partículas com DNA foram utilizadas nos disparos.

Todo o material utilizado nos experimentos de bombardeamento como membranas carreadoras, telas de retenção, membranas de ruptura, e suportes para membranas carreadoras (BIO-RAD) foram desinfetados com etanol absoluto por 3 minutos e secos em condições assépticas (fluxo laminar). Para os disparos, 5 µL da suspensão de partículas com o DNA foram colocados no centro da membrana carreadora.

As condições de bombardeamento utilizadas, como a distância do alvo e a pressão de disparo, foram previamente otimizadas utilizando o plasmídeo pFF19G (Figura 10). A expressão transitória do gene *uid-A* (GUS) em folhas de fumo bombardeadas com o plasmídeo pFF19G foi analisada histoquimicamente seguindo o método descrito por Jefferson, Kavanagh e Bevan (1987) que consiste em colocar as folhas em contato com a solução de X-Gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucorônico) e incubar a 37°C por 20 horas.

Os pontos azuis observados nas folhas foram analisados quanto à distribuição e quantidade de pontos. Cada ponto azul, independente do tamanho ou intensidade, foi contado como um ponto de expressão do gene *uid-A* (Figura 11B).

Figura 11 - (A) Folhas de fumo com a face abaxial voltada para cima, posicionada no centro da placa para o bombardeamento; (B) Folhas de fumo bombardeadas com o plasmídeo pFF19G apresentando expressão transitória do gene da β -glucoronidase *uid-A*. Cada ponto azul foi considerado expressão GUS nos experimentos de otimização

As condições de bombardeamento selecionadas para todos os experimentos de transformação foram as seguintes:

- distância do alvo: a placa de Petri contendo o tecido alvo foi colocada em prateleira com distância de 11 cm da membrana carreadora.
- pressão de disparo: membrana de ruptura de 1100 psi.

3.3.4 Co-transformação com vetor pHA9

Para a precipitação dos plasmídeos na superfície das partículas de tungstênio, utilizou-se o protocolo descrito no item 3.3.3. Os experimentos de co-transformação foram realizados com a combinação dos plasmídeos no preparo das partículas de tungstênio, adicionando-se 5 μ g de cada plasmídeo na suspensão de tungstênio, sendo divididos em bombardeamentos com pDM8 e pHA9 ou pDM9 e pHA9.

Foram realizados sete experimentos de bombardeamento com calos embriogênicos de cana da variedade RB835089 nos subcultivos R3, R4 e R5. O número total de disparos foi de 186, sendo 66 disparos com pDM8 e pHA9, e 120 disparos com pDM9 e pHA9. As placas de Petri com meio de cultura MS3AC sólido, suplementado com manitol 0,4 M e sorbitol 0,4M (FALCO, 1998), denominado meio osmótico, foram utilizadas para o posicionamento dos calos embriogênicos. Estes foram dispostos em um círculo central de 6 cm de diâmetro, sob papel de

filtro autoclavado, sendo mantidos no escuro a $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ por quatro horas antes do bombardeamento. Após os disparos, os explantes foram mantidos por mais quatro horas no meio osmótico para depois serem transferidos para o meio de cultura MS3AC sólido e incubados no escuro a $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ por cinco dias.

Manitol e sorbitol são álcoois hexahídricos frequentemente empregados como agentes que elevam a pressão osmótica do meio de cultura de bombardeamento. O tratamento osmótico tem efeito fundamental na prevenção de rupturas e vazamento do conteúdo celular, frente à agressão física às células, bem como ter facilitado a penetração das partículas (FALCO, 1998). Os danos e injúrias extratecidas (RASCO-GAUNT et al., 1999; TEE; MAZIAH, 2005), necroses, e ausência de formação de novos calos ou embriões somáticos (TADESSE et al., 2003) são alguns dos efeitos adversos dos tecidos bombardeados que não passaram pelo tratamento osmótico.

3.3.5 Seleção, regeneração e obtenção de plantas transgênicas

Após o período de estabilização (cinco dias) dos calos em meio MS3AC para recuperação das células bombardeadas, estes foram transferidos para meio contendo 30 mg.L^{-1} de geneticina filtro-esterilizada, adicionada ao meio de cultura MS3AC sólido após a autoclavagem. Seguidos 25 dias no meio de cultura seletivo em condição de escuro a $27\pm 2^{\circ}\text{C}$, os calos foram transferidos para frascos de vidro contendo meio de regeneração de plântulas MSAC sólido, mantendo-se a concentração de geneticina (30 mg.L^{-1}), sendo incubados a $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas. O tempo de regeneração das plântulas variou de 30 a 40 dias, não havendo alteração no meio de cultura para enraizamento das mesmas. A pressão de seleção foi mantida durante toda a fase *in vitro*. As plântulas que enraizaram foram individualizadas e transferidas para meio fresco MSAC sólido com geneticina (30 mg.L^{-1}), e posteriormente analisadas por métodos moleculares e bioquímicos.

Segundo Falco (1998), a melhor opção para seleção de células de plantas monocotiledôneas transformadas com o gene *neo* (NPTII) é o antibiótico geneticina, pois não interfere no processo de regeneração e pode, portanto, ser utilizado para seleção em estágios iniciais. Partindo desse princípio, optou-se por utilizar o antibiótico geneticina no meio de cultura para seleção de células transformadas e regeneração de plantas transgênicas. O antibiótico canamicina tem se mostrado pouco eficaz como agente seletivo em gramíneas, quando comparada a sua atuação em espécies dicotiledôneas. Seu uso em espécies monocotiledôneas tem

sido desencorajado devido ao alto nível de resistência endógena e pela interferência na regeneração de células transformadas (HAUPTMANN et al., 1988; NEHARA et al., 1994).

3.4 Transformação genética de cana-de-açúcar via *Agrobacterium tumefaciens*

3.4.1 Linhagem, plasmídeo e condições de cultura de *A. tumefaciens*

A linhagem EHA105 de *A. tumefaciens* foi utilizada para transformação com o plasmídeo vetor pNW166 (Figura 7; WATANABE; LAM, 2008). A construção utilizada contém na região do T-DNA dois genes: o gene da neomicina fosfotransferase (NPTII) que confere resistência ao antibiótico geneticina e o cDNA do gene *AtBI-1* para supressão da morte celular programada induzida por estresse. Os dois genes estão sob controle do promotor *CaMV35S*.

As células bacterianas foram cultivadas por 48 horas sob agitação constante de 150 rpm a 28°C em 50 mL de meio YEB (BRASILEIRO, 1998) contendo 50 mg.L⁻¹ de canamicina, até atingirem a fase logarítmica de crescimento (DO₆₀₀ = 1,0). Então, a cultura bactéria foi sedimentada por centrifugação a 4700 x g por 10 minutos a temperatura ambiente e ressuspensa em meio MS líquido que é o meio basal MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose (pH 5,8), acrescido de 100 mM de acetoseringona (STACHEL et al., 1985). A suspensão de bactérias foi incubada por duas horas sob agitação constante de 150 rpm a 28°C para induzir a sua virulência devido à presença de acetoseringona.

3.4.2 Inoculação e co-cultura

Duas técnicas foram testadas para transformação genética de calos embriogênicos de cana via *A. tumefaciens*: (a) inoculação direta dos calos em suspensão bacteriana; e (b) agrobiolística que é o bombardeamento dos calos com partículas de tungstênio M10 seguido da inoculação em suspensão bacteriana.

Na técnica de incubação direta dos calos em suspensão bacteriana, foram preparadas placas de Petri com calos embriogênicos da subcultura R3, sob papel de filtro autoclavado, os quais foram posicionados no centro formando um círculo cheio de 6 cm. Os calos foram mantidos no meio osmótico por quatro horas (no escuro a 27±2°C) antes de serem incubados com a suspensão de agrobactéria por 10 minutos sob agitação de 150 rpm a 28°C no escuro. Em seguida foram mantidos em repouso por 10 minutos. Posteriormente, os calos foram filtrados e lavados por três vezes com meio MS líquido sem acetoseringona, em condições assépticas, sendo

levemente secos sob papel de filtro autoclavado. Então, os calos foram incubados em placas de Petri com meio de cultura MSAC sólido sob papel de filtro. O tempo de co-cultivo foi de três dias, em condição de escuro a $27\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Na técnica da agrobiolística, as placas de Petri com meio MS3AC sólido acrescido de sorbitol 0,4 M e manitol 0,4 M (meio osmótico) foram preparadas com calos embriogênicos da subcultura R3, sob papel de filtro autoclavado, os quais foram posicionados no centro formando um círculo cheio de 6 cm. Os calos foram mantidos no meio osmótico por quatro horas (no escuro a $27\pm 2^{\circ}\text{C}$) antes do disparo. Seguiu-se o protocolo de assepsia e fragmentação das partículas de tungstênio descrita no item 3.3.3, sem a etapa de precipitação de DNA plasmidial nas partículas. Os parâmetros do bombardeamento foram: distância do alvo de 11 cm e pressão de disparo de 1100 psi. Após o disparo os calos foram transferidos para suspensão de agrobactéria por 10 minutos sob agitação de 150 rpm a 28°C no escuro, e em seguida foram mantidos em repouso por 10 minutos. Então, os calos foram filtrados e lavados por três vezes com meio MS líquido sem acetoseringona, em condições assépticas, sendo levemente secos sob papel de filtro autoclavado. Finalmente os calos foram incubados em placas de Petri com meio de cultura MSAC sólido sob papel de filtro. O tempo de co-cultivo foi de três dias, em condição de escuro a $27\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Para cada técnica de transformação foram realizados cinco repetições dos experimentos e em cada um utilizaram-se cinco placas de Petri com calos embriogênicos.

3.4.3 Seleção, regeneração e obtenção de plantas transgênicas

Após o co-cultivo dos explantes com a cultura bacteriana, estes foram lavados com meio MS líquido, acrescido do antibiótico cefotaxima (500 mg.L^{-1}) que inibe o crescimento da agrobactéria, e transferidos para meio de cultura MS3AC sólido contendo 500 mg.L^{-1} de cefotaxima e 30 mg.L^{-1} do antibiótico geneticina para seleção de células transformadas. Neste meio os explantes foram mantidos por 25 dias (escuro a $27\pm 2^{\circ}\text{C}$) e então repicados para o mesmo meio de cultura fresco, onde foram mantidos por mais 15 dias.

Após 40 dias em condição de seleção das células transformadas, os calos que se multiplicaram foram transferidos para frascos de vidro contendo meio de regeneração MSAC sólido acrescido de 500 mg.L^{-1} de cefotaxima e 30 mg.L^{-1} de geneticina, e incubados em fotoperíodo de 16 horas a $27\pm 2^{\circ}\text{C}$.

A regeneração das plântulas transgênicas ocorreu em um período de 20 a 30 dias na luz, sendo os brotos separados e cultivados individualmente por 30 dias em meio MSAC sólido acrescido de 500 mg.L⁻¹ de cefotaxima e 30 mg.L⁻¹ de geneticina. As plântulas que enraizaram foram analisadas por métodos bioquímicos e moleculares.

3.5 Caracterização molecular das plantas transgênicas

3.5.1 Extração de DNA total e análises de PCR

A extração de DNA total de folhas de plântulas de cana resistentes a geneticina que estavam enraizando foi pelo método baseado em CTAB desenvolvido por Doyle e Doyle (1990). Para verificar a qualidade e quantidade de DNA nas amostras, foram aplicadas alíquotas de 10% do volume total de DNA acrescido de *loading buffer* (70% de glicerol; 100 mM de Tris-HCl; 20 mM de EDTA; 0,2% de SDS; 2,5% de azul de bromofenol) em gel de agarose 0,8% (TAE 1x, 3 V.cm⁻¹) ao lado de concentrações diferentes do plasmídeo pGEM não digerido (50, 100 e 200ng) para quantificação do DNA.

O DNA foi utilizado em reações de PCR (reação em cadeia da polimerase) para confirmação da presença dos transgenes *neo* e cDNA de *AtBI-1* nas plântulas. O protocolo das reações foi: desnaturação inicial por 5 minutos a 95°C; 35 ciclos: 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 60°C, 1 minuto a 72°C; extensão final por 5 minutos a 72°C. Os pares de *primers* utilizados para confirmação da presença dos transgenes foram:

- Para o gene *neo*:

nptII (Forward): 5' – GAG GCT ATT CGG CTA TGA CTG – 3'

nptII (Reverse): 5' – TCG ACA AGA CCG GCT TCC ATC – 3'

O tamanho do fragmento amplificado é de 410 pb. A posição dos *primers* no plasmídeo pHA9 está na Figura 5.

- Para o cDNA do gene *AtBI-1* sob controle do promotor *CaMV35S* (plasmídeo pDM8):

35S (Forward): 5' – CGC ACA ATC CCA CTA TCC TTC – 3'

Bi (Reverse): 5' – CAT AGT CCA TGT CAC CGA GGT – 3'

O tamanho do fragmento amplificado é de 830 pb. A posição dos *primers* no plasmídeo pDM8 está na Figura 6.

- Para o cDNA do gene *AtBI-1* sob controle do promotor *Ubi-1* (plasmídeo pDM9):

Ubi-1 (Forward): 5' – GCC CTG CCT TCA TAC GCT ATT – 3'

Bi (Reverse): 5' – CAT AGT CCA TGT CAC CGA GGT – 3'

O tamanho do fragmento amplificado é de 820 pb. A posição dos *primers* no plasmídeo pDM9 está na Figura 8.

Em todas as reações de PCR foram utilizados como controles: DNA plasmidial como controle positivo (pHA9, pDM8 ou pDM9, conforme o promotor localizado *upstream* de *AtBI-1*), DNA da planta não transformada RB835089 (controle negativo), e ddH₂O (controle da reação).

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

Para comprovar que o cDNA do gene *AtBI-1* estava sendo transcrito, selecionou-se algumas das plântulas de cana que apresentaram PCR positivo para a presença dos transgenes *neo* e cDNA de *AtBI-1* para análise de RT-PCR (reação da transcriptase reversa, seguida da reação da polimerase em cadeia). A extração de RNA total iniciou com a coleta de folhas de plântulas *in vitro* as quais foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e trituradas em almofariz. Pequenas quantidades foram transferidas para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL até atingir a marca de aproximadamente 0,1 mL para o isolamento de RNA total com o reagente Trizol *Reagent* (Invitrogen), de acordo com o método recomendado pelo fabricante. O RNA isolado foi analisado em gel de agarose 1,2 % (TAE 1x, 5 V.cm⁻¹). Aproximadamente 5,0 µg do RNA total foram tratados com *Amplification grade* DNase I livre de RNase (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. O tratamento do RNA total com DNase I é indicado para eliminar possíveis contaminações com DNA genômico, o que pode comprometer a amplificação correta da sequência dos cDNAs.

O RNA total tratado com DNase I foi utilizado para a síntese do cDNA total foliar, obtido através do *kit SuperScript First Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen), tendo os oligo(dT) do *kit* como *primers*.

Para normalização do RT-PCR, o cDNA total foi utilizado como molde para a amplificação de um fragmento do cDNA da β -actina de cana com o par de *primers* gentilmente cedido pelo Dr. Fábio Nogueira. As sequências dos *primers* foram desenhadas com base no clone do SUCEST denominado scbgad1025B04.g, as quais são: Fw: 5' – CTT AGG TTG GAT CTT

GCT GG – 3'; Rv: 5' – TTA GAA GCA TTT TCG GTG GAC –3'. O tamanho do fragmento amplificado é 570 pb.

As reações de PCR foram realizadas conforme o protocolo: desnaturação inicial por 3 minutos a 95°C; 30 ciclos: 45 segundos a 95°C, 45 segundos a 55°C, 45 segundos a 72°C; extensão final por 10 minutos a 72°C.

Uma alíquota referente a 10 % do volume de cada produto de PCR foi analisada em gel de agarose 1 % (TAE 1x, 3 V.cm⁻¹). Após a verificação do tamanho esperado do produto de amplificação e a estimativa da quantidade de cDNA total em cada amostra, procedeu-se a reação de PCR com quantidades similares do cDNA total das plantas selecionadas novamente com o par de *primers* da β -actina. Tendo confirmado a normalização das quantidades de cDNA total, partiu-se para as reações de PCR com quantidades similares de cDNA total e os *primers* específico para o cDNA do gene *AtBI-1* o qual foi desenhado no segundo éxon (*primer Bi-forward*: 5' – GAC CTT ATG TTG TGC TCT TGT – 3') e quinto éxon (*primer Bi-reverse*: 5' – CAT AGT CCA TGT CAC CGA GGT – 3') do gene, amplificando um fragmento de 506 pb. A posição dos *primers* nos plasmídeos pDM8 e pDM9 está nas Figuras 6 e 8.

A reação de PCR com os *primers Bi-forward* e *Bi-Reverse* foi realizada conforme o protocolo: desnaturação inicial por 5 minutos a 95°C; 30 ciclos: 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 60°C, 1 minuto a 72°C; extensão final por 5 minutos a 72°C. Como controles foram utilizados o cDNA da planta não transformada RB835089 (controle negativo) e o DNA plasmidial pDM8 ou pDM9 (controle positivo).

As amostras de PCR foram aplicadas em gel de agarose 1 % (TAE 1x, 3 V.cm⁻¹), e, quando se confirmou o tamanho esperado para o produto de amplificação, comparou-se os níveis de expressão dos transgenes pela intensidade das bandas de cada planta.

Uma das amostras de RT-PCR do cDNA do gene *AtBI-1* foi utilizada como molde para a reação de sequenciamento (ver item 3.6) com o objetivo de confirmar que a amplificação foi do transgene inserido na planta.

3.5.3 Extração de proteínas e análise de expressão por *Western Blot*

Para comprovar a expressão do cDNA do gene *AtBI-1* nas plantas transformadas, utilizou-se a técnica de *Western blot*. Para isso, foram selecionadas as plantas que apresentaram resultado positivo no RT-PCR do cDNA *AtBI-1*.

Para extração de proteínas solúveis totais, foram coletadas folhas jovens das plantas transgênicas e da planta não transformada *in vitro* na quantidade de 200 mg, triturando-as em nitrogênio líquido para obtenção de um pó fino. Adicionou-se 400 μ L de tampão de extração (63 mM de Tris-HCl pH 7,0; 5% de β -mercaptoetanol; 2% de SDS; 10% glicerol), homogeneizou-se, e, em seguida incubou-se em banho-maria fervente durante 10 minutos, levando ao gelo em seguida. Centrifugou-se durante 10 minutos a 17.949 x g, temperatura ambiente, e transferiu-se o sobrenadante para novo tubo.

As amostras de proteína foram mantidas no gelo e imediatamente quantificadas utilizando o método de Bradford (1976). Para tanto, utilizou-se 100 μ L do extrato diluído duas vezes acrescentado de 5 mL do reagente BRADFORD, resultando numa mistura colorida, que foi lida a 595 nm em espectrofotômetro. O reagente foi preparado com 100 mg de COOMASSIE BRILLIANT BLUE G-250 dissolvido em 50 mL de etanol absoluto, 100 mL de ácido fosfórico 85%. O volume da mistura foi aferido para 1 L e filtrado duas vezes em filtro de papel qualitativo da marca REAGEN. O teor de proteína das amostras foi calculado a partir de uma curva padrão feita com albumina de soro bovina (BSA) (Sigma) e expresso em mg.g^{-1} de matéria fresca. As proteínas foram mantidas no gelo até o momento de serem aplicadas no gel de poliacrilamida.

Para o preparo dos géis de poliacrilamida, utilizou-se o sistema SDS-PAGE. O gel de separação foi preparado em concentração de 12% com 3,2 mL de ddH_2O ; 4,0 mL de acrilamida : bisacrilamida (28,8 : 0,8); 2,5 mL de 1,5 M de Tris-HCl pH 8,8; 200 μ L de SDS 10%; 100 μ L de persulfato de amônio (100 mg.mL^{-1}) e 4 μ L de TEMED. Este gel foi vertido entre as placas de vidro previamente montadas conforme indicação do fabricante (BIO-RAD) com espaçador de 0,75 cm. Antes da polimerização, aplicou-se isobutanol saturado com água em volume suficiente para cobrir o gel. Após 30 minutos, retirou-se o álcool e lavou-se com ddH_2O , eliminando o excesso com papel. Para a formação do gradiente, preparou-se o gel concentrador (5%) com 2,1 mL de ddH_2O ; 0,5 mL de acrilamida : bisacrilamida (28,8 : 0,8); 0,38 mL de 1 M Tris-HCl pH 6,8; 60 μ L de SDS 10%; 30 μ L de persulfato de amônio (100 mg.mL^{-1}) e 3 μ L de TEMED. Este gel foi vertido e colocou-se o pente para formar os poços. Antes da aplicação no gel de poliacrilamida, quantidades similares de proteína de cada planta foram preparadas com o mesmo volume de azul de bromofenol e incubadas em banho-maria fervente por 10 minutos. Após resfriamento em gelo por 5 minutos, as amostras foram aplicadas no gel ao lado do marcador de médio peso molecular, com tampão de corrida (1x) (25 mM de Tris base, 192 mM de glicina,

0,1% de SDS, ddH₂O). Iniciou-se a corrida eletroforética a 70 volts, passando a 100 volts após atingir a diferença de concentração. Quando a frente azul de bromofenol atingiu o fim do gel, desligou-se a voltagem.

Paralelamente foram preparados dois géis SDS-PAGE 12% contendo as amostras de proteínas totais extraídas das folhas jovens de plantas de cana transgênicas e da planta não transformada. O objetivo foi utilizar um gel para *Western blotting* e o outro gel para a coloração com Coomassie para avaliação do perfil protéico do extrato em PAGE, mostrando que quantidades similares de proteínas foram utilizadas para a imunodeteção de AtBI-1-V5His₆ nas folhas das plantas.

O gel não corado prosseguiu para a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose (MSI - 0,45 µ). O gel foi equilibrado com o tampão de transferência gelado (25 mM de Tris pH8,3; 192 mM de glicina e 20% de metanol) por 20 minutos. A membrana de nitrocelulose foi cortada com as dimensões do gel e incubada em ddH₂O por 5 minutos e posteriormente equilibrada em tampão de transferência gelado por 25 minutos. Utilizando o aparelho da BIO-RAD Trans-blot SD, realizou-se a transferência a 100 volts por 1 hora. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi mantida no aparato do aparelho a 4°C durante 16 horas. No dia seguinte, fez-se o bloqueio dos sítios inespecíficos na membrana incubando-a em tampão TTBS (1x) (20 mM Tris pH 8,0; 500 mM NaCl; 0,05% de Tween-20) com 5% de leite em pó desnatado durante 30 minutos sob agitação lenta e constante. Em seguida, a membrana foi incubada no tampão TTBS (1x) com 2% de leite em pó desnatado e o anticorpo primário anti-V5 (Invitrogen) em uma diluição de 1 : 5000. A membrana foi mantida com o anticorpo por 4 horas em temperatura ambiente sob agitação lenta e constante, e, posteriormente foi colocada a 4°C por 16 horas sob a mesma agitação.

No dia seguinte a membrana foi lavada oito vezes com o tampão TTBS (1x) por 8 minutos cada, sob agitação lenta e constante a temperatura ambiente. Então, a membrana foi incubada em TTBS com 2% de leite em pó desnatado e o anticorpo secundário Anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina [*Anti-mouse IgG (whole molecule) – Alkaline Phosphatase, developed in goat*, SIGMA] em uma diluição de 1 : 25000. A membrana foi mantida sob a mesma agitação por 4 horas e então, fez-se a lavagem da mesma oito vezes por 8 minutos cada com o tampão TTBS (1x).

Para a revelação, aplicou-se 1 mL do substrato quimioluminescente Lumi-PhosTM WB (PIERCE) no centro da membrana e cobriu-a com plástico, incubando por 3 minutos. O excesso do substrato foi drenado e expôs-se a membrana a um filme de raio-X por 1 minuto. A revelação foi feita em sala escura incubando o filme em solução reveladora (KODAK) por 5 minutos, seguida da lavagem em água, e então se incubou na solução fixadora (KODAK) por 5 minutos, finalizando com a lavagem em água. Foi observado se a imagem estava ou não satisfatória, e então, aumentou-se o tempo de exposição.

3.5.4 Análise da integração do DNA pela técnica de *Southern Blot*

Foram selecionadas algumas plantas de cana transgênicas que apresentaram PCR positivo para o gene *neo* e o cDNA de *AtBI-1* para análise da integração e número de cópias do *AtBI-1* no genoma. Para isso, o DNA total de folhas destas plantas foi extraído pelo método do CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990). Cada amostra de DNA (aproximadamente 20 µg) foi submetida à digestão conjunta com as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI para analisar a integração do *AtBI-1* no genoma. Para determinar o número de cópias inseridas do transgene no genoma, foram realizadas digestões independentes com as enzimas *Nco*I e *Hind*III. Utilizaram-se 15 unidades de cada enzima por reação, incubando a 37°C por 6 horas em volume total de 50 µL. As digestões foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (tampão TAE 1x, 3 V.cm⁻¹) com brometo de etídio, juntamente com os controles que foram: as digestões do DNA da planta não transformada com as mesmas enzimas analisadas, o DNA da sonda (0,5 ng) descrito abaixo, o DNA não digerido de uma planta transgênica. Logo após a eletroforese, o gel foi fotografado juntamente com uma régua que permitiu correlacionar a altura da banda obtida ao peso molecular do marcador *1Kb plus DNA ladder* utilizado nesta etapa. A transferência dos DNAs para a membrana de nylon (HybondTMN⁺, Amersham Biosciences) foi realizada segundo o método de *Southern*, o qual se constitui do seguinte procedimento: após a corrida eletroforética, o gel foi tratado por 15 minutos com 250 mL de solução de *Southern* I (0,25 M HCl) em agitação lenta; em seguida, esta solução foi descartada e lavou-se o gel com ddH₂O; adicionou-se 250 mL de solução de *Southern* II (0,5 M NaOH) ao gel e incubou-se por 30 minutos em agitação lenta; descartou-se esta solução e lavou-se o gel com ddH₂O; adicionou-se 250 mL de solução de *Southern* III (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl) ao gel e incubou-se por 30 minutos em agitação lenta;

esta solução foi descartada e novamente o gel foi lavado com ddH₂O, sendo finalmente incubado com a solução de *Southern IV* (1 M Tris pH 6,5; 3 M NaCl) durante 15 minutos.

Após o tratamento do gel com as soluções de *Southern*, procedeu-se a transferência dos DNAs digeridos para a membrana de nylon através de um sistema de capilaridade montado como descrito a seguir. Em um recipiente de vidro contendo 0,5 L de tampão SSC 20x (3 M NaCl; 0,3 M citrato de sódio pH 7,0), foi colocada uma lâmina de vidro atravessada contendo quatro faixas de papel de filtro umedecidas neste tampão formando uma ponte. Sobre esta faixa de papel foi colocado o gel invertido (com os poços voltados para baixo), o qual foi molhado com o tampão SSC 20x e coberto com a membrana de nylon com as dimensões do gel anteriormente incubada em ddH₂O por 5 minutos e no tampão SSC 20X por 15 minutos. Sobre a membrana de nylon, colocou-se papel de filtro, papel absorvente com altura de 6 cm, e um peso de aproximadamente 1 kg por cima. No dia seguinte, o sistema foi desmontado e a membrana foi submetida à luz UV do aparelho Stratalinker[®] UV *crosslinker* (parâmetros: 700nm por 1 minuto) para a fixação do DNA à membrana.

Como sonda para hibridização, utilizou-se um fragmento de 1000 pb que corresponde a sequência *AtBI-1-V5His₆::T-Nos*. Este fragmento foi obtido a partir da digestão do vetor pDM8 ou pDM9 com as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI, visualizados em gel de agarose, isolados e purificados com o DNA *Extraction Kit* (*Fermentas Life Sciences*).

A sonda foi marcada de forma não radioativa utilizando-se o kit *Gene ImagesTM Alkphos Direct Labeling and Detection System* (*Amersham Biosciences*). Para isso, 10 µL do DNA usado como sonda (concentração de 10 ng/µL) foi desnaturado em banho-maria fervente por 5 minutos, colocado imediatamente no gelo por mais 5 minutos antes da adição dos componentes do kit: 10 µL de *Reaction Buffer*, 2 µL de *Labeling Reagent* e 10 µL de *Cross Linker* diluído em ddH₂O (1 : 5). Esta reação foi mantida a 37°C por 30 minutos. As condições de hibridização, lavagem e exposição da membrana de nylon ao filme de raio-X após hibridização foram as mesmas recomendadas pelo fabricante do kit *AlkPhos*. As etapas para revelação do filme foram às mesmas descritas no item 3.5.3.

3.6 Bioensaio de plantas transgênicas com antibiótico tunicamicina

Para validação da expressão do cDNA *AtBI-1* nas plantas transgênicas de cana-de-açúcar, realizou-se o bioensaio com o indutor de estresse no retículo endoplasmático (RE), o antibiótico tunicamicina (Sigma).

A tunicamicina (TM) é um antibiótico isolado inicialmente de *Streptomyces lysosuperificus* (TAKATSUKI; ARIMA; TAMURA, 1971), cuja estrutura química é formada por uracil, uma cadeia de ácido graxo variável nos diferentes compostos da família, N-acetilglicosamina e aminodialdose. Seu mecanismo de ação está relacionado com a interrupção da síntese do oligossacarídeo durante as primeiras etapas do processo de glicosilação de proteínas. Isto ocorre devido à competição da TM e da N-acetilglicosamina pelo grupo fosfato do carreador dolicol fosfato (HEIFETZ; KEENAN; ELBEIN, 1979; LEHNINGER; NELSON; COX, 1995). Foi relatado que a TM induziu a morte celular programada em células de plantas (CROSTI; MALERBA; BIANCHETTI, 2001) e de mamíferos por estímulo do estresse no RE (FUJITA et al., 2002).

Foram selecionadas algumas plantas transgênicas que apresentaram maior expressão do cDNA do gene *AtBI-1* as quais são: (a) obtidas por biolística: pMD8-1 (*CaMV35S* :: *AtBI-1-V5His₆* :: *T-Nos*); pDM9-3 e pDM9-4 (*Ubi-1* :: *AtBI-1-V5His₆* :: *T-Nos*); (b) obtidas por *Agrobacterium tumefaciens* (*CaMV35S* :: *AtBI-1-V5His₆* :: *T-Nos*): ID-3 (inoculação direta dos calos na suspensão de agrobactéria) e AB-1 (Agrobiolística). Como controle utilizou-se a planta não transformada (Controle).

Foram realizados dois experimentos iguais para aumentar a confiabilidade dos resultados, sendo testados três tratamentos em meio de cultura MS líquido que é o meio basal MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose e pH 5,8. Os tratamentos foram os seguintes: T1: controle sem antibiótico TM; T2: 0,5 mg.L⁻¹ de TM filtro-esterilizada; T3: 1,0 mg.L⁻¹ de TM filtro-esterilizada.

O número de repetições por tratamento para cada planta foi cinco e como foram realizados dois experimentos, o número de plantas avaliadas por tratamento foi de dez.

As plantas selecionadas para o bioensaio estavam em condições *in vitro* com idade de quatro semanas. Elas foram avaliadas quanto ao comprimento (mm) das raízes antes de serem incubadas nos tratamentos. Os experimentos foram mantidos sob fotoperíodo de 20 horas e 27±2°C por 12 dias. A cada três dias foram feitas as avaliações de comprimento (mm) de raiz,

além de observar a existência de características típicas da morte celular programada (MCP) como a clorose das folhas e paralisação do desenvolvimento do sistema radicular nas plantas analisadas.

Após 12 dias da instalação do bioensaio, determinou-se o conteúdo de clorofila total das folhas das plantas avaliadas segundo a metodologia de Lichtenthaler (1987). Para isso, amostras de 100 mg de tecido foliar fresco foram coletadas e incubadas em 4 mL de acetona 80% em tubo com tampa, onde permaneceram por 24 horas a 4°C, protegidas da luz. Então os extratos foram filtrados e a leitura efetuada em espectrofotômetro a 663 e 647 nm para clorofilas *a* e *b*, respectivamente. Os cálculos de mg de clorofila por grama matéria fresca (MF) de tecido foliar basearam-se nas equações abaixo relacionadas, segundo Whitham et al. (1971):

$$\text{Clorofila } a \text{ (mg.gMF}^{-1}\text{)} = \frac{[(12,7 \times \text{Abs}_{663} - 2,69 \times \text{Abs}_{647})] \times V}{1000 \times \text{MMF}}$$

$$\text{Clorofila } b \text{ (mg.gMF}^{-1}\text{)} = \frac{[(22,9 \times \text{Abs}_{647} - 4,68 \times \text{Abs}_{663})] \times V}{1000 \times \text{MMF}}$$

$$\text{Clorofila total (mg.gMF}^{-1}\text{)} = \frac{(7,15 \times \text{Abs}_{663}) + (18,71 \times \text{Abs}_{647})}{1000 \times \text{MMF}}$$

em que Abs é a absorbância no comprimento de onda indicado, V é o volume final do extrato clorofila-acetona (mL), e MMF é a massa da matéria fresca em gramas do material vegetal utilizado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção de calos e regeneração de plântulas da variedade RB835089 *in vitro*

Calos embriogênicos de cana da variedade RB835089 foram obtidos de segmentos transversais de folhas imaturas inoculados em meio MS3AC (descrito no item 3.1.1), sob condição de escuro a $27\pm 2^{\circ}\text{C}$, aonde permaneceram por 25 dias. Após este período, os calos foram subcultivados e transferidos para meio fresco sob as mesmas condições. Após outros 25 dias, os calos foram selecionados sob uma lupa baseando-se nas características morfológicas (calo nodular, compacto e branco) e então subcultivados por outros 25 dias sob as mesmas condições. Em cada fase de subcultivo, entre R1 a R5, os calos foram avaliados quanto à capacidade em regenerar plântulas quando inoculados em meio MSAC (descrito no item 3.1.2), sendo incubados em sala de crescimento (temperatura $27\pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo 16 horas). O objetivo foi verificar em que idade (fase de subcultivo) os calos embriogênicos regeneravam o maior número de plântulas e associá-la à melhor fase para realizar os ensaios de bombardeamento para transformação genética. Deve-se considerar que a utilização efetiva de abordagens biotecnológicas, como a transformação genética, depende de sistemas eficientes e confiáveis de regeneração *in vitro*.

O número de plântulas obtido está presente na Tabela 1.

Tabela 1 - Escolha da fase de subcultivo para bombardeamento dos calos de cana-de-açúcar, variedade RB835089

Fase de subcultivo	Porções de calos cultivados	Plantas obtidas	Plantas obtidas/calos cultivados
R1	25	0	0
R2	25	5	0,2
R3	25	50	2
R4	25	50	2
R5	25	96	3,84

Observa-se que quanto maior a idade do repique, mais plântulas regeneraram, pois, os calos R5 passaram por mais etapas de seleção em meio de cultura MS3AC, que contém auxina 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e água de coco, sendo a maioria linhagens embriogênicas. Os mesmos biorreguladores foram utilizados com sucesso para indução de calos em cana-de-açúcar por Falco, Tulmann Neto e Ulian (2000).

Tal como acontece com a maioria dos membros da família Poaceae, o 2,4-D é a auxina mais efetiva para a indução de calos embriogênicos em cana-de-açúcar (HO; VASIL, 1983). Esta afirmação foi validada por outros estudos (CHEN et al., 1988; FITCH; MOORE, 1990; LIU, 1993; CHENGALRAYAN; GALLO-MEAGHER, 2001; DESAI et al., 2004; HEERDT, 2008). Lakshmanan (2006) afirmou que o 2,4-D e os ácidos clorofenoxiacético, em geral, são muito superiores do que outros reguladores de crescimento vegetal comumente utilizados para a embriogênese somática em cana, comprovando os resultados relatados por Ho e Vasil (1983).

Devido ao fato da água de coco conter citocininas naturais, adicioná-la ao meio de cultura frequentemente tem o mesmo efeito da adição de uma citocinina. Isto significa um efeito benéfico no crescimento e morfogênese sendo também fonte de *myo*-inositol que é um constituinte natural das plantas, sendo incorporado em fosfatidil-inositol, um fator importante no funcionamento das membranas (GEORGE; HALL; KLERK, 2008). Contudo, a concentração dos constituintes da água de coco não é uniforme nos frutos ou lotes do produto industrializado. Neste trabalho não houve alteração nos resultados obtidos dos diferentes experimentos utilizando o composto industrializado.

A oxidação dos explantes foi reduzida pela adição de ácido cítrico (150 mg.L^{-1}) nos meios de cultura MS3AC e MSAC. Resultados similares foram obtidos por Lakshmanan et al. (2006) quando utilizaram a mesma concentração de ácido cítrico para pré-tratamento de segmentos transversais excisados de folhas imaturas.

O tempo para regeneração de brotos na variedade estudada, para todas as fases de subcultivo, foi de aproximadamente 20 dias após a incubação dos calos selecionados em meio de regeneração MSAC na ausência de auxina e água de coco. A regeneração de plântulas também foi alcançada pela transferência dos calos ao meio MS na ausência da auxina por Falco, Tulmann Neto e Ulian (2000) e Snyman et al. (2006).

A quantidade de plântulas regeneradas na fase R2 foi muito inferior às fases R3, R4 e R5 (Tabela 1), optando-se por utilizar estas três últimas fases nos experimentos de transformação genética via biolística, e a fase mais jovem R3 nos ensaios de transformação via *Agrobacterium tumefaciens*. Segundo Arencibia et al. (1998), a utilização de calos jovens e regeneráveis como explantes para o co-cultivo com *A. tumefaciens* é um dos principais fatores a fim de aumentar a competência das células para o processo de transferência do T-DNA. Os calos embriogênicos jovens apresentam disponibilidade de substâncias indutoras dos genes *vir*, produzem poucas

substâncias tóxicas a agrobactéria, apresentam quantidades adequadas de hormônios endógenos, e disponibilidade de receptores para a ligação da *A. tumefaciens* (SCHLAPPI; HOHN, 1992; ARENCIBIA et al., 1998). Além disso, a utilização de calos embriogênicos jovens poderia eliminar problemas com variação somaclonal. Nos estágios iniciais de desenvolvimento, os embriões somáticos podem se comportar similarmente aos embriões sexuais para a transferência do T-DNA (ARENCIBIA et al., 1998).

Desta forma, visando também à padronização dos explantes utilizados, optou-se pela produção a cada 25 dias de material *in vitro*, o que garantiu a constância e uniformidade no fornecimento de calos embriogênicos de boa qualidade para os experimentos.

4.2 Seleção do transgene para transformação genética de cana-de-açúcar

4.2.1 Análise *in silico* da proteína AtBI-1

Esta análise foi realizada com o intuito de conhecer o transgene selecionado para a transformação genética de cana-de-açúcar, o qual é o cDNA do gene *AtBI-1* isolado do cromossomo 5 (Figura 12 A, B e C) do genoma de *Arabidopsis thaliana* (SANCHEZ; TORRES ZEBALA; GRANT, 2000). A proteína AtBI-1 é homóloga a BI-1 de mamíferos e tem o papel de atenuar a morte celular programada induzida por estresses bióticos e abióticos.

O gene *AtBI-1* (número de acesso no GenBank: AB025927) contém 1515 pb, apresentando 6 éxons e 5 íntrons (Figura 12C). Ele codifica 247 aminoácidos que compõem a proteína de aproximadamente 27 kDa. A proteína AtBI-1 apresenta 6 domínios transmembrana (Figura 12C), estando localizada na membrana do retículo endoplasmático (WATANABE; LAM, 2008). Isto sugere que a proteína pode formar canais de condução de íons de uma maneira similar aos poros formados na membrana mitocondrial para as proteínas Bcl-2 e Bax (LAM; KATO; LAWTON, 2001).

A Figura 12 apresenta as características do gene e da proteína em estudo.

Figura 12 - Caracterização do gene *AtBI-1*. (A) Histograma de distribuição dos genes no cromossomo 5 do genoma de *A. thaliana*. (B) A posição do gene *AtBI-1* no cromossomo 5 está entre 19,15 e 19,16 Mb. (C) O fragmento verde representa o gene propriamente dito; os blocos azuis representam as posições dos éxons; os blocos vermelhos representam os 6 domínios transmembrana da proteína AtBI-1

A região codificadora do gene *AtBI-1*, que representa o cDNA sintetizado a partir do mRNA, contém 744 pb (Figura 12C). Este é o fragmento que foi isolado e clonado no plasmídeo pNW166 (Figura 7, item 3.3.1) por Watanabe e Lam (2008). E no presente trabalho este cDNA de *AtBI-1* foi subclonado nos plasmídeos pDM8 (Figura 6) e pDM9 (Figura 8).

4.2.2 Análise filogenética da proteína BI-1

As sequências de aminoácidos (aa) das proteínas BI-1 de espécies Poaceae como cana (*Saccharum officinarum*, número de acesso no TIGR: TA37987_4547), milho (*Zea mays*, número de acesso no TIGR: TA180002_4577), sorgo (*Sorghum bicolor*, número de acesso no TIGR: TA24631_4558), arroz (*Oriza sativa*, número de acesso no TIGR: TA31702_4530), trigo (*Triticum aestivum*, número de acesso no TIGR: TA65195_4565), cevada (*Hordeum vulgare*, número de acesso no TIGR: TA32197_4513), braquipódio (*Brachypodium distachyon*, número de acesso no TIGR: TA569_15368), centeio (*Secale cereale*, número de acesso no TIGR: TA1543_4550), e a proteína AtBI-1 (número de acesso no TIGR: CF652183) de *Arabidopsis thaliana* foram alinhadas utilizando o algoritmo de alinhamento múltiplo CLUSTAL W que é programa acessório do software *BioEdit Sequence Alignment Editor* (HALL, 1999) (acesso: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Isto foi realizado com objetivo de utilizar a matriz de alinhamento para a análise filogenética empregando o software MEGA4 versão 4.0 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (TAMURA et al., 2007). Também, analisou-se o nível de identidade entre a sequência de aa da proteína AtBI-1, utilizada nas construções dos

vetores para transformação genética de cana-de-açúcar, e as sequências de aa de BI-1 de espécies Poaceae, tendo por base que o gene *BI-1* é evolutivamente conservado em eucariotos (TAKABATAKE et al., 2007).

A Figura 13 mostra o alinhamento obtido com as sequências de aa das proteínas BI-1 analisadas.

Figura 13 - Alinhamento das seqüências de aa das proteínas BI-1 de espécies Poaceae, e AtBI-1 de *A. thaliana*. Os pontos representam os aa que são idênticos aos de *A. thaliana*; os traços representam *indel* (inserção / deleção de aminoácidos)

Como se observa na Tabela 2, o nível de identidade (%) entre as sequências de aa das proteínas BI-1 das espécies Poaceae é mais conservado entre elas, provavelmente porque apresentam uma história evolutiva mais próxima, além de serem espécies monocotiledôneas, diferentes de *A. thaliana* que é dicotiledônea. A identidade entre as proteínas BI-1 das espécies

Poaceae e AtBI-1 de *A. thaliana* varia de 65,8 a 68,2% (Tabela 2). Este resultado corrobora com os resultados obtidos por Hückelhoven, Dechert e Kogel (2003), que relataram que as proteínas BI-1 de plantas têm de 29 a 35% de identidade e aproximadamente 50% de similaridade com a proteína BI-1 de humano.

Kawai et al. (1999) compararam a estrutura primária de BI-1 de arroz (OsBI-1) e AtBI-1 com os homólogos de outros organismos e observaram que a massa molecular de OsBI-1 é de 25,9 kDa, que similar à proteína BI-1 de mamíferos. A sequência de aa de OsBI-1 apresenta 41,5% e 67,7% de identidade com BI-1 de mamíferos e AtBI-1, respectivamente. O comprimento predito das proteínas da família BI-1 é conservado entre diferentes espécies (KAWAI et al., 1999).

Com o interesse de estudar a conservação evolutiva da morte celular em plantas e metazoários, Yu et al. (2002) pesquisaram a função de AtBI-1 no sistema celular de mamíferos. Desde que a sequência de aa de AtBI-1 divide 41% de identidade com BI-1 de mamíferos, estes pesquisadores anteciparam que AtBI-1 pode prevenir a morte celular induzida por Bax nas células de mamíferos.

Tabela 2 - Matriz de identidade (%) entre as sequências de aa das proteínas BI-1 de espécies Poaceae e AtBI-1*

	At	So	Zm	Sb	Os	Ta	Hv	Bd	Sc
At	100	-	-	-	-	-	-	-	-
So	68,2	100	-	-	-	-	-	-	-
Zm	68,2	88,1	100	-	-	-	-	-	-
Sb	68,2	90,6	83,8	100	-	-	-	-	-
Os	67,7	87,3	82,2	86,5	100	-	-	-	-
Ta	68	82,8	78,9	82,9	88,6	100	-	-	-
Hv	67,6	83,2	80,1	83,4	89	97,8	100	-	-
Bd	65,8	81,6	79,7	82,5	86,4	90,4	90	100	-
Sc	68	83,6	79,7	83,8	89,4	99,1	98,7	91,2	100

* As siglas presentes na tabela representam as letras iniciais de gênero e espécie: At – *A. thaliana*, So – *S. officinarum*; Zm – *Zea mays*; Sb – *S. bicolor*; Os – *O. sativa*; Ta – *T. aestivum*; Hv – *H. vulgare*; Bd – *B. distachyon*; Sc – *S. cereale*

Uma análise filogenética distinta foi estimada com a matriz de alinhamento dos aa das proteínas BI-1 pelo método de inferência de máxima parcimônia, utilizando o *software* MEGA4 versão 4.0 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (TAMURA et al., 2007). Nesta análise foram incluídas as espécies Poaceae como cana (*Saccharum officinarum*), milho (*Zea mays*),

sorgo (*Sorghum bicolor*), arroz (*Oriza sativa*), trigo (*Triticum aestivum*), cevada (*Hordeum vulgare*), braquipódio (*Brachypodium distachyon*), centeio (*Secale cereale*). A árvore teve como grupo externo a proteína AtBI-1, cuja origem é dicotiledônea.

A Figura 14 mostra a árvore de parcimônia estrito consenso (filograma). A topologia da árvore está de acordo com os resultados obtidos com a análise de BI-1 em outros trabalhos (KAWAI et al., 1999; HÜCKELHOVEN, 2004).

A árvore foi dividida em dois principais clados, um contendo as espécies de cana e sorgo e outro que inclui as espécies de arroz, trigo, centeio, cevada e braquipódio (Figura 14). Os ramos tiveram suporte de *bootstrap* de moderado (70 - 94%) a robusto (95-100%). Apenas o milho não se agrupou nos clados, provavelmente por apresentar mutações na sequência de aa que são exclusivas da espécie (Figura 13).

Figura 14 - Árvore de máxima parcimônia obtida com as seqüências de aa das proteínas BI-1 de espécies Poaceae, tendo AtBI-1 de *A. thaliana* como grupo externo. Os números indicam as porcentagens de *bootstrap* maiores que 50%

4.2.3 Construção dos vetores de transformação pDM8 e pDM9

As análises de restrição dos plasmídeos recombinantes obtidos de pDM8 e pDM9 estão presentes nas Figuras 15 e 16, respectivamente. O plasmídeo pDM8 foi clivado com as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI e o plasmídeo pDM9 foi clivado com as enzimas *Hind*III e *Bam*HI, e os produtos das digestões separados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Os padrões de banda encontrados corroboram com os resultados esperados, tendo como base a análise dos

mapas de restrição da sequência gênica original (os tamanhos dos fragmentos estão nas Figuras 6 e 8).

Figura 15 - Análise de restrição do plasmídeo pDM8 digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI e separado em gel de agarose 1%. L: 1Kb plus DNA ladder; 1: Digestão de pDM8

Figura 16 - Análise de restrição do plasmídeo pDM9 digerido com enzimas de restrição *Hind*III e *Bam*HI e separado em gel de agarose 1%. L: 1Kb plus DNA ladder; 1: Digestão de pDM9

4.2.4 Sequenciamento do cDNA de *AtBI-1* clonado

O sequenciamento da região codificadora *AtBI-1-V5-His6* (Figura 17A) dos plasmídeos pDM8 e pDM9 comprovou a autenticidade das regiões clonadas, sendo confirmado pelas análises dos cromatogramas de sequenciamento utilizando o software Vector NTI Suíte 5.0. Estas sequências foram avaliadas pelo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)/NCBI (acesso na homepage <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/BLAST/>) (ALTSCHUL et al., 1990) quando se observou a existência de similaridade com outras sequências disponíveis no GenBank (Figura

13), além da própria sequência de *AtBI-1* de *A. thaliana*. Como resultado da análise por *tBLASTx*, presente na Figura 17B, observou-se a presença dos homólogos de BI-1 de outros organismos como cevada, arroz, trigo, tomate, soja, entre outros.

Figura 17 – (A) Parte do sequenciamento do cDNA *AtBI-1* que está fusionado ao V5-*His₆* tagged, sendo apontadas as posições do cDNA *AtBI-1*, V5 epitopo, região de polihistidina e o terminador T-Nos; (B) Análise da sequência *AtBI-1*-V5-*His₆* dos plasmídeos pDM8 e pDM9 através do *tBLASTx/NCBI*

4.3 Transformação genética de cana-de-açúcar por Biolística e *Agrobacterium tumefaciens*

Tendo em vista a existência de dois métodos promissores para transformação genética de cana-de-açúcar como a biolística e o mediado por *A. tumefaciens*, foram realizados experimentos para compará-los utilizando calos embriogênicos de cana para transformação com o gene *neo* e o cDNA *AtBI-1*.

A transformação genética por biolística se mostrou um método relativamente simples, mas que requer atenção especial com a suspensão de partículas utilizada no disparo, evitando a formação de aglomerados de partículas (grumos) os quais podem levar a morte das células

atingidas por eles no bombardeamento. A biolística é considerada o principal método para transformação de cana (BIRCH, 1997; MOORE, 1999).

A transformação genética por *A. tumefaciens* também se mostrou uma técnica simples, e, além disso, econômica e eficiente. A transformação mediada por *Agrobacterium* em monocotiledôneas não era possível até recentemente, quando metodologias reprodutíveis e eficientes foram estabelecidas (ARENCIBIA et al., 1998; ENRIQUEZ-OBREGON et al., 1998; ELLIOTT et al., 1998; MANICKAVASAGAM et al. 2004).

A transformação mediada por *Agrobacterium* oferece algumas vantagens em comparação com os métodos de transformação direta, tais como: transferência de segmentos relativamente grandes de DNA com pequenos rearranjos e integração de pequenos números de cópias do gene nos cromossomos da planta (ENRIQUEZ-OBREGON et al., 1998).

Com relação aos explantes utilizados nos dois métodos de transformação, os calos embriogênicos de cana-de-açúcar da variedade RB835089 se mostraram muito eficientes como tecidos alvos para a transformação genética da cultura, facilitando a seleção dos calos transformados em meio de cultura com o antibiótico geneticina, o que é comprovado pelos resultados obtidos por Birch et al. (1995), Arencibia et al. (1998), Falco, Tulmann Neto e Ulian (2000), Saciloto (2003), Camargo (2007), Ribeiro (2007).

Segundo Falco (1998) é necessário atentar para a quantidade de experimentos necessários quando se visa à obtenção de plantas transgênicas, já que muitas células transformadas não se dividem, reduzindo a possibilidade de obtenção de plantas transgênicas. Portanto é necessário trabalhar com grandes quantidades de calos.

O tempo mínimo para obtenção das plantas transgênicas de cana por biolística foi em média 175 dias, sendo 75 dias para obtenção de calos em fase de subcultivo R3, 5 dias para estabilização dos calos bombardeados em meio MS3AC, 55 dias no processo seletivo e 40 dias no enraizamento e aclimatização. Este tempo para obtenção das plantas transgênicas foi relativamente menor ao relatado por Falco (1998), que conseguiu estabelecer um protocolo de transformação genética de cana com resultados em 200 dias.

Para a transformação mediada por *A. tumefaciens*, o tempo mínimo para obtenção das plantas transgênicas de cana foi 178 dias, sendo 75 dias para obtenção de calos em fase de subcultivo R3, 3 dias de co-cultivo dos explantes com a cultura bacteriana, 60 dias no processo seletivo e 40 dias no enraizamento e aclimatização.

A Figura 18 mostra em um esquema representativo as etapas dos métodos de transformação genética de cana-de-açúcar por biolística e *Agrobacterium tumefaciens* utilizados no trabalho. Como se observa, os dois métodos seguem as mesmas etapas para a obtenção das plantas transgênicas, tendo como diferença o tipo de transferência dos genes para dentro da célula, podendo ser direta com a utilização do equipamento acelerador de partículas denominado bombardeador (Figura 18A), ou indireta quando o DNA exógeno é inserido no genoma pela ação de um vetor biológico como a *A. tumefaciens* (Figura 18B). Para a transformação mediada por *A. tumefaciens* foram testados duas técnicas: (a) inoculação direta dos calos em suspensão bacteriana; e (b) agrobiolística que é o bombardeamento dos calos com partículas de tungstênio para gerar os ferimentos nos mesmos seguidos da inoculação em suspensão bacteriana. O objetivo deste teste foi verificar se é necessário induzir ferimentos nos calos para aumentar a eficiência de transformação mediada por *A. tumefaciens*. Compostos fenólicos como acetoseringona ativam os genes *vir* no plasmídeo Ti, sendo que a sua adição no meio de co-cultivo promove a alta eficiência na transformação (HIEI et al., 1994). Para maximizar a eficiência de transformação de cana com o gene *neo* e o cDNA *AtBI-1*, empregou-se a acetoseringona e a linhagem virulenta EHA105.

Com relação ao processo de seleção, os meios de cultura utilizados nos métodos de biolística e *A. tumefaciens* foram os mesmos, havendo apenas a suplementação com o antibiótico cefotaxima (500 mg.L⁻¹) para inibir o crescimento da agrobactéria na transformação mediada por ela.

Figura 18 - Esquema representativo dos métodos de transformação genética de cana-de-açúcar por biolística e *A. tumefaciens*. A: Aparelho acelerador de partículas utilizado para o bombardeamento de DNA precipitado às partículas de tungstênio ou ouro. B: Cultura de *A. tumefaciens* linhagem EHA 105, com o vetor binário pNW166, para incubação dos calos embriogênicos, podendo ser inoculação direta ou por agrobiolística. C: Calos em meio osmótico sob papel de filtro e dispostos em um círculo central para biolística ou agrobiolística. D: Seleção de células transformadas em meio seletivo com antibiótico. E: Regeneração de brotos em meio seletivo. F: Observação de brotos em lupa. G e H: Enraizamento de plântulas em meio seletivo. I: Plantas regeneradas sob aclimação em substrato

4.3.1 Eficiência da transformação genética de cana-de-açúcar

No presente trabalho, a eficiência da transformação foi calculada se baseando na relação entre o total de plantas com PCR positivo para os transgenes *neo* e cDNA *AtBI-1* e o número de calos bombardeados ou inoculados em cultura de agrobactéria para cada experimento. Cada uma destas plantas foi considerada um evento independente de transformação.

Os resultados dos experimentos de transformação por biolística (co-transformação) e por *A. tumefaciens* (inoculação direta e agrobiolística) estão sintetizados nas Tabelas 3, 4, 5 e 6.

Nos experimentos de co-transformação com pH9 utilizando os vetores de transformação pDM8 (*CaMV35S :: AtBI-1-V5His₆ :: T-Nos*) (Tabela 3) e pDM9 (*Ubi-1 :: AtBI-1-V5His₆ :: T-Nos*) (Tabela 4) foi observado que a quantidade de brotos resistentes ao antibiótico geneticina, ainda não enraizados, foi maior do que o número total de plantas enraizadas que apresentaram resultados positivos nas análises de PCR para os transgenes *neo* e cDNA *AtBI-1* (Figuras 19 a 22). Este mesmo resultado foi observado nas duas técnicas de transformação via *A. tumefaciens* (inoculação direta e agrobiolística) com o vetor binário pNW166 (*CaMV35S :: AtBI-1-V5His₆ :: T-Nos*). Isto mostra a existência de brotos escapes na seleção inicial realizada *in vitro* com o antibiótico geneticina. Nos experimentos de biolística e *Agrobacterium*, os brotos regenerados na seleção inicial foram individualizados e transferidos para meio fresco MSAC sólido com geneticina (30 mg.L⁻¹), e àqueles que cresceram e enraizaram no meio seletivo posteriormente foram analisados por métodos moleculares como a análise de PCR. A existência de plantas escapes no processo de seleção com geneticina também foi relatada por Falco, Tulmann Neto e Ulian (2000) e Arencibia et al. (1998).

Tabela 3 - Resultado da co-transformação de cana-de-açúcar, variedade RB835089, com os plasmídeos pHA9 e pDM8 (*CaMV35S :: AtBI-1-V5His₆ :: T-Nos*)

Experimento pDM8 + pHA9	Nº de Placas bombardeadas	Nº de calos bombardeados ^a	Nº de brotos resistentes a geneticina	Total de plantas PCR(+) <i>neo</i>	Total de plantas PCR (+) <i>neo / AtBI-1</i>	Eficiência de co-transformação (%) ^b
1	18	900	16	15	13	1,44
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	12	600	16	11	10	1,67
5	12	600	4	4	2	0,33
6	12	600	2	2	2	0,33
7	12	600	4	4	3	0,50
Total	66	3300	42	36	30	0,91

^a Cada placa bombardeada apresentava 50 calos (explantes).

^b A eficiência de co-transformação (%) é o total de plantas com PCR positivo para os transgenes *neo* e *AtBI-1* dividido pelo número de calos bombardeados.

Tabela 4 - Resultado da co-transformação de cana-de-açúcar, variedade RB835089, com os plasmídeos pHA9 e pDM9 (*Ubi-1 :: AtBI-1-V5His₆ :: T- Nos*)

Experimento pDM9 + pHA9	Nº de placas bombardeadas	Nº de calos bombardeados ^a	Nº de brotos resistentes a geneticina	Total de plantas PCR (+) <i>neo</i>	Total de plantas PCR (+) <i>neo / AtBI-1</i>	Eficiência de co-transformação (%) ^b
1	-	-	-	-	-	-
2	24	1200	13	10	5	0,42
3	24	1200	50	40	27	2,25
4	18	900	21	19	15	1,67
5	18	900	16	10	8	0,89
6	18	900	26	5	4	0,44
7	18	900	13	10	8	0,89
Total	120	6000	139	94	67	1,12

^a Cada placa bombardeada apresentava 50 calos (explantes).

^b A eficiência de co-transformação (%) é o total de plantas com PCR positivo para os transgenes *neo* e *AtBI-1* dividido pelo número de calos bombardeados.

Tabela 5 - Resultado da transformação genética de cana-de-açúcar, variedade RB835089, mediada pela inoculação direta dos calos em cultura de *A. tumefaciens*, linhagem EHA105, que contém o vetor binário pNW166

Experimento N°	N° de Placas Inoculação Direta	N° de calos Inoculados ^a	N° de brotos resistentes a geneticina	Total de plantas PCR (+) neo	Total de plantas PCR (+) neo / AtBI-1	Eficiência de transformação (%) ^b
1	5	250	5	5	5	2
2	5	250	3	3	3	1,2
3	5	250	-	-	-	-
4	5	250	35	32	32	12,8
5	5	250	13	12	12	4,8
Total	25	1250	56	52	52	4,16

^a Cada placa para inoculação direta apresentava 50 calos (explantes).

^b A eficiência de transformação (%) é o total de plantas com PCR positivo para os transgenes *neo* e *AtBI-1* dividido pelo número de calos inoculados com agrobactéria.

Tabela 6 - Resultado da transformação genética de cana-de-açúcar, variedade RB835089, por agrobiolística com *A. tumefaciens*, linhagem EHA105, que contém o vetor binário pNW166

Experimento N°	N° de Placas Agrobiolística	N° de calos Inoculados ^a	N° de brotos resistentes a geneticina	Total de plantas PCR (+) neo	Total de plantas PCR (+) neo / AtBI-1	Eficiência de transformação (%) ^b
1	5	250	-	-	-	-
2	5	250	53	48	48	19,2
3	5	250	3	3	3	1,2
4	5	250	4	4	4	1,6
5	5	250	26	23	23	9,2
Total	25	1250	86	78	78	6,24

^a Cada placa utilizada na agrobiolística apresentava 50 calos (explantes).

^b A eficiência de transformação (%) é o total de plantas com PCR positivo para os transgenes *neo* e *AtBI-1* dividido pelo número de calos inoculados com agrobactéria.

A eficiência de co-transformação com os plasmídeos pDM8 e pHA9 (Tabela 3) variou de 0,33% a 1,67%. Para os experimentos realizados com estes dois plasmídeos a eficiência atingiu 0,91%, considerando as plantas obtidas com PCR positivo para os dois transgenes, *neo* e cDNA *AtBI-1*, dividido pelo número total de calos bombardeados com pDM8 e pHA9. Para os experimentos de co-transformação com os plasmídeos pDM9 e pHA9 (Tabela 4), a eficiência de co-transformação foi relativamente maior e variou de 0,42% a 2,25%. Para os experimentos

realizados com estes dois plasmídeos a eficiência atingiu 1,12%, valor superior ao obtido com o plasmídeo pDM8 que apresenta o promotor *CaMV35S* dirigindo a expressão do cDNA *AtBI-1*.

Os resultados de eficiência de co-transformação apresentados estão de acordo com o relatado por Li, Pan e Xu (2003) que obtiveram 1,22% de frequência de regeneração de canas transgênicas com inserção dos genes *LEAFY* e *neo*. Por outro lado, Fitch et al. (1996) mostraram uma eficiência de transformação de duas linhagens transgênicas por bombardeamento, entretanto, os genes *neo* e *Bt* estavam na mesma construção gênica.

No presente trabalho, 83% das plantas que apresentaram PCR positivo para o gene *neo* também mostraram PCR positivo para o cDNA *AtBI-1* para a co-transformação com pDM8 (Tabela 3). Já para a co-transformação com pDM9, 71,3% das plantas com PCR positivo para o gene *neo* também apresentaram PCR positivo para o cDNA *AtBI-1*. Bower et al. (1996) relataram a obtenção de $19,8 \pm 3,7$ plantas transgênicas independentes por bombardeamento de uma seleção com geneticina, sendo que de 67 a 79% das linhagens de calo selecionadas para resistência a geneticina também apresentaram atividade luciferase conferida pelo gene *luc*, o que representa a alta eficiência de co-transformação.

As possíveis explicações para uma baixa eficiência de transformação genética pelo método de biolística incluem a baixa eficiência de integração do DNA introduzido, devido, por exemplo, à quantidade insuficiente de DNA, à utilização de dois plasmídeos para co-transformação havendo integração independente dos transgenes no genoma, ou a baixa sobrevivência das células que sofreram com o impacto do bombardeamento (HUNOLD; BRONNER; HARNER, 1994).

Para os experimentos de transformação mediados por *A. tumefaciens* linhagem EHA105 a eficiência de transformação foi relativamente maior do que a da co-transformação, atingindo valores máximos de 12,8% e 19,2% para inoculação direta e agrobiolística, respectivamente. O valor da eficiência de transformação para todos os experimentos realizados empregando a técnica de inoculação direta foi de 4,16% e para agrobiolística foi de 6,24%. A agrobiolística, que apresentou a maior eficiência de transformação, é a técnica que empregou o bombardeamento dos calos com partículas de tungstênio para gerar os ferimentos nos mesmos seguidos da inoculação em suspensão bacteriana. Os ferimentos liberam compostos fenólicos que ativam os genes *vir* no plasmídeo Ti, o que pode ter promovido a maior eficiência na transformação.

Arencibia et al. (1998) foram os primeiros a produzir cana-de-açúcar transgênica morfológicamente normal após o co-cultivo com *Agrobacterium* linhagens LBA4404 e EHA101 carregando um vetor super binário. Neste trabalho os pesquisadores relatam que obtiveram uma eficiência de transformação variando de 0,94% a 1,15%, valores inferiores aos máximos obtidos no presente trabalho.

Na literatura os valores de eficiência de transformação mediada por *Agrobacterium* são variáveis, sendo que Enriquez-Obregon et al. (1998) obtiveram de 10 a 35% de eficiência quando utilizaram *A. tumefaciens* linhagem At2260 e discos de folhas imaturas como explantes; já Manickavasagam et al. (2004) atingiram uma eficiência de transformação de 50% utilizando a linhagem EHA105 e gemas axilares como explante.

De acordo Shrawat e Lörz (2006), a utilização de calos jovens regeneráveis como explantes alvo, a indução e/ou melhoramento do sistema de virulência da bactéria com culturas celulares e a pré-indução de organogênese ou embriogênese somática são parâmetros cruciais para aumentar a competência das células para a transferência do T-DNA, o que se aplica aos experimentos desenvolvidos no presente trabalho para transformação de cana mediada por *A. tumefaciens*.

Diferente dos resultados obtidos por Enriquez-Obregon et al. (1997), no presente trabalho não houve necrose e morte celular dos calos após a infecção com *Agrobacterium*, não sendo fatores limitantes para o desenvolvimento de interações eficientes do explante de cana com *Agrobacterium*.

4.4 Caracterização molecular das plantas transgênicas

4.4.1 Seleção das plantas transformadas por análises de PCR

Para analisar a presença dos transgenes nas plantas, foram extraídos DNAs totais das plantas potencialmente transgênicas, que enraizaram em meio seletivo, e da planta não transformada para posteriores análises por PCR utilizando pares de *primers* específicos (descritos no item 3.5.1). Para o transgene *neo* foi utilizado um par de *primers* que se ligam na região codificadora do mesmo, amplificando um fragmento esperado de 410 pb. Para o cDNA do gene *AtBI-1* sob controle dos promotores *CaMV35S* (plasmídeo pDM8) e *Ubi-1* (plasmídeo pDM9) optou-se por um *primer forward* no promotor e um *primer reverse* na região codificadora de *AtBI-1*, amplificando fragmentos esperados de 830 e 820 pb, respectivamente. Tendo por base

que as plantas, como a cana-de-açúcar, apresentam seus próprios homólogos de *BI-1* (KAWAI et al., 1999; SANCHEZ; TORRES ZEBALA; GRANT, 2000; KAWAI-YAMADA et al., 2001; BOLDUC; BRISSON, 2002; BOLDUC et al., 2003; HÜCKELHOVEN; DECHERT; KOHEL, 2003; MATSUMURA et al., 2003; COUPE et al., 2004; EICHMANN et al., 2004; KAWAI-YAMADA; OHMORI; UCHIMIYA, 2004), optou-se por desenhar o *primer forward* no promotor para a confirmação da presença do cDNA de *AtBI-1* nas prováveis canas transgênicas.

Do total de 42 e 139 brotos resistentes a geneticina obtidos pelas co-transformações com pHA9 e os plasmídeos pDM8 e pDM9 (Tabelas 3 e 4), respectivamente, 36 plantas pHA9/pDM8 e 94 plantas pHA9/pDM9 amplificaram o fragmento esperado de 410 pb do gene *neo*. A Figura 19 representa um dos géis de agarose 1% contendo os produtos de PCR de *neo*. A planta não transformada foi utilizada como controle negativo e na reação não apresentou banda de amplificação.

Figura 19 - Análise da presença do gene *neo* nos possíveis transformantes. Gel de agarose 1% mostrando produtos amplificados a partir de amostras de DNA de folhas de cana-de-açúcar. L: *1Kb plus DNA ladder*; colunas 1 a 15: plantas selecionadas da co-transformação pHA9/pDM8; colunas 16 a 28: plantas selecionadas da co-transformação pHA9/pDM9; C+: controle positivo (pHA9); C-: planta não transformada; H₂O: controle da reação

Nas Tabelas 5 e 6 foi observado que dos 56 e 86 brotos resistentes a geneticina obtidos pelas técnicas de inoculação direta e por agrobiolística, respectivamente, 52 plantas da inoculação direta e 78 plantas da agrobiolística apresentaram PCR positivo para o gene *neo*, amplificando o fragmento de 410 pb. A Figura 20 representa um dos géis de agarose 1% contendo os produtos de PCR de *neo*. A planta não transformada foi utilizada como controle negativo e na reação não apresentou banda de amplificação.

Figura 20 - Análise da presença do gene *neo* nos possíveis transformantes. Gel de agarose 1% mostrando produtos amplificados a partir de amostras de DNA de folhas de cana-de-açúcar. L: 1Kb plus DNA ladder; colunas 1 a 3: plantas selecionadas da inoculação direta de calos em cultura de agrobactéria; colunas 4 e 5: plantas selecionadas da agrobiolística; C-: planta não transformada; C+: controle positivo (pNW166); H₂O: controle da reação

Como se observa nas Tabelas 3 e 4, no método de transformação por biolística nem todas as plantas que contém o gene *neo*, apresentam o cDNA *AtBI-1*. Isto se justifica pela integração independente dos transgenes no genoma, sendo que os mesmos estão em plasmídeos distintos. Além disso, o número de cópias dos transgenes inseridos no genoma pode variar. Já na transformação por *Agrobacterium*, todas as plantas analisadas apresentam os dois transgenes que estão presentes no mesmo vetor binário pNW166 entre as bordas direita e esquerda e são necessárias para a transferência dos mesmos para a célula vegetal.

A seleção das plantas transgênicas quanto a presença do cDNA *AtBI-1*, que anteriormente amplificaram o fragmento do gene *neo*, foi realizada pela análise de PCR com amplificação de um fragmento de 830 pb para a co-transformação com o vetor plasmidial pDM8 e a transformação por *Agrobacterium* com o vetor binário pNW166. Estes vetores apresentam o cassette *CaMV35S::AtBI-1-V5His₆::T-Nos*. Para estas reações de PCR foram utilizados os primers *CaMV35S (Forward)* e *Bi (Reverse)*. A Figura 21 mostra um dos géis de agarose 1% contendo os produtos de PCR do cDNA *AtBI-1* que está sob o controle do promotor *CaMV35S*. A planta não transformada foi utilizada como controle e na reação não apresentou banda de amplificação.

Figura 21 - Análise da presença do cDNA *AtBI-1* dirigido pelo promotor *CaMV35S* nos possíveis transformantes. Gel de agarose 1% mostrando produtos amplificados a partir de amostras de DNA de folhas de cana-de-açúcar. L: *1Kb plus DNA ladder*; colunas 1 a 5: plantas selecionadas da inoculação direta em cultura de agrobactéria; colunas 6 a 10: plantas selecionadas da agrobiolística; colunas 11 a 16: plantas selecionadas da co-transformação com pHA9 e pDM8; C-: planta não transformada; H₂O: controle da reação; C+: controle positivo (pDM8)

Para as plantas transgênicas obtidas da co-transformação com os plasmídeos pHA9 e pDM9, cujo PCR do gene *neo* foi positivo, foram analisadas por PCR para confirmação da presença do cassete *Ubi-1 :: AtBI-1-V5His₆ :: T-Nos*. Os *primers* utilizados para isso foram o *Ubi-1 (Forward)* e *Bi (Reverse)*, havendo amplificação do fragmento esperado de 820 pb. A Figura 22 mostra um dos géis de agarose 1% contendo os produtos de PCR do cDNA *AtBI-1* que está sob o controle do promotor *Ubi-1*. A planta não transformada foi utilizada como controle e na reação não apresentou banda de amplificação.

Figura 22 - Análise da presença do cDNA *AtBI-1* dirigido pelo promotor *Ubi-1* nos possíveis transformantes. Gel de agarose 1% mostrando produtos amplificados a partir de amostras de DNA de folhas de cana-de-açúcar. L: *1Kb plus DNA ladder*; colunas 1 a 10: plantas selecionadas da co-transformação com pHA9 e pDM9; C-: planta não transformada; H₂O: controle da reação; C+: controle positivo (pDM9)

Após seleção das plantas transformadas pela confirmação da integração dos transgenes no genoma, as mesmas foram aclimatadas, sendo transferidas do meio de cultura para vaso contendo substrato Plantimax umedecido, e sobre eles foram colocados sacos plásticos para manter a umidade relativa. Então, estes vasos com plantas transgênicas foram incubados em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

4.4.2 Análise de expressão do cDNA *AtBI-1* nas plantas transgênicas

Para comprovar que o cDNA do gene *AtBI-1* estava sendo transcrito, foram selecionadas aleatoriamente algumas das plantas de cana que apresentaram PCR positivo para a presença dos transgenes *neo* e *AtBI-1*, sendo analisadas por RT-PCR (reação da transcriptase reversa seguida da reação de PCR). Desta forma foi avaliado o nível de expressão dos transcritos *AtBI-1* em diferentes plantas transformadas, considerando que os promotores selecionados para controlar este transgene são constitutivos (pDM8 e pNW166: promotor *CaMV35S*; pDM9: promotor *Ubi-1*), diferente da expressão do *BI-1* endógeno que provavelmente aumenta a expressão quando induzido por estresses bióticos e abióticos e durante a senescência da planta.

As 25 plantas selecionadas para extração de RNA total para posterior síntese do cDNA total foliar foram as seguintes:

- 6 plantas obtidas por co-transformação com pHA9 e pDM8: pDM8-1, pDM8-2, pDM8-3, pDM8-4, pDM8-5, pDM8-6.
- 6 plantas obtidas por co-transformação com pHA9 e pDM9: pDM9-1, pDM9-2, pDM9-3, pDM9-4, pDM9-5, pDM9-6.
- 6 plantas obtidas por transformação via inoculação direta (ID) em cultura de agrobactéria: ID-1, ID-2, ID-3, ID-4, ID-5, ID-6.
- 6 plantas obtidas por transformação via agroboliística (AB): AB-1, AB-2, AB-3, AB-4, AB-5, AB-6.
- 1 planta de cana da variedade RB835089 não transformada (Controle).

A Figura 23 representa um dos géis de agarose 1,2%, corado com brometo de etídeo, contendo algumas amostras de RNA total extraído de folhas de cana-de-açúcar pelo método do Trizol. Estes RNAs tratados com DNase I foram utilizado para a síntese do cDNA total foliar, utilizando o kit *SuperScript First Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen), tendo os oligo(dT) do kit como *primers*. O RNA é uma molécula instável, principalmente porque ele pode

ser degradado por RNAses. Na Figura 23 se observa que todas as amostras estão com o padrão de bandas de RNA íntegro.

Figura 23 - Amostras de RNA total de folhas de cana-de-açúcar, extraído pelo método do Trizol. Gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídeo. Coluna 1: RNA total da planta não transformada; colunas 2 a 11: RNA total de plantas transformadas

Para normalização do RT-PCR, o cDNA total foi utilizado como molde para a amplificação de um fragmento do cDNA da β -actina presente na membrana celular de cana com os *primers* Fw e Rv, descritos no item 3.5.2. Os fragmentos amplificados apresentaram o tamanho esperado de 570pb, como se observa nas Figuras 24 e 25. A normalização foi feita calculando a razão da intensidade total das bandas presentes no gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo.

Figura 24 - Normalização do RT-PCR com *primers* da β -actina de cana-de-açúcar. L: 1Kb plus DNA ladder; C-: planta não transformada; colunas 1 a 6: plantas da co-transformação com pHA9 e pDM8; colunas 7 a 12: plantas da co-transformação com pHA9 e pDM9

Figura 25 - Normalização do RT-PCR com *primers* da β -actina de cana-de-açúcar. L: *1Kb plus DNA ladder*; C-: planta não transformada; colunas 1 a 6: plantas da transformação por inoculação direta (ID) de calos em cultura de agrobactéria; colunas 7 a 12: plantas da transformação por agrobiolística (AB)

Foram definidas as quantidades de cDNA total presentes em cada amostra de planta com base na intensidade das bandas amplificadas de β -actina. Então, partiu-se da mesma quantidade de cDNA total para realizar as reações de PCR com os *primers* *Bi* (*Forward*) e *Bi* (*Reverse*) (descritos no item 3.5.1) posicionados nos éxons do cDNA de *AtBI-1*. As Figuras 26 e 27 mostram os géis de agarose 1% corados com brometo de etídeo que são resultados da análise de RT-PCR do cDNA *AtBI-1* realizada com as 24 plantas transformadas que foram selecionadas e a planta não transformada. Os fragmentos amplificados apresentaram o tamanho esperado de 506 pb. Foi possível detectar uma expressão diferencial entre as plantas transformadas e nenhuma expressão na planta não transformada. Além do controle negativo (planta não transformada), a reação de RT-PCR teve como controle positivo os DNAs plasmidiais pDM8 e pDM9.

Figura 26 - Análise de expressão do cDNA *AtBI-1* por RT-PCR nas plantas transformadas por co-transformação com pHA9. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, mostrando produtos de amplificação por PCR a partir de amostras de cDNA total de folhas de cana-de-açúcar não transformada e plantas transformadas. L: *1Kb plus DNA ladder*; C-: planta não transformada; colunas 1 a 6: plantas transformadas com pDM9 na ordem – pDM9-1, pDM9-2, pDM9-3, pDM9-4, pDM9-5, pDM9-6; colunas 7 a 12: plantas transformadas com pDM8 na ordem – pDM8-1, pDM8-2, pDM8-3, pDM8-4, pDM8-5, pDM8-6; C+: plasmídeo pDM9

Baseando-se na intensidade das bandas presentes no gel da Figura 26, as plantas que apresentaram níveis de expressão, de forma crescente, foram: pDM8-3, pDM8-5, pDM8-2, pDM8-1, pDM9-1, pDM9-2, pDM9-4, pDM9-3.

A amostra de RT-PCR do cDNA *AtBI-1* da planta pDM9-3 foi utilizada como molde para a reação de sequenciamento com o objetivo de confirmar que a amplificação foi do transgene inserido na planta. A sequência foi avaliada pelo *BLAST* quando se confirmou a existência de similaridade com outras sequências disponíveis no *GenBank*, além da própria sequência de mRNA de *AtBI-1* de *A. thaliana*.

De acordo com as reações de amplificação do cDNA *AtBI-1* (Figuras 26) foi possível detectar maior expressão deste transgene nas plantas transformadas com o plasmídeo pDM9, em que o promotor *Ubi-1* controla a expressão constitutiva do cDNA *AtBI-1*, comparado com as plantas transformadas por pDM8, cujo promotor constitutivo é o *CaMV35S*.

As plantas de cana transformadas por *A. tumefaciens* também apresentaram variações nos níveis de expressão do cDNA *AtBI-1* que está sob controle do promotor *CaMV35S*, como demonstrado na Figura 27. Baseando-se na intensidade das bandas presentes no gel da Figura 27, as plantas que apresentaram níveis de expressão, de forma crescente, foram: AB-6, AB-1, ID-5, ID-3, ID-4, AB-3, AB-5 e AB-4.

Figura 27 - Análise de expressão do cDNA *AtBI-1* por RT-PCR nas plantas transformadas por *A. tumefaciens* linhagem EHA105, contendo vetor binário pNW166. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, mostrando produtos de amplificação por PCR a partir de amostras de cDNA total de folhas de cana-de-açúcar não transformada e plantas transformadas. L: *1Kb plus DNA ladder*; C-: planta não transformada; colunas 1 a 6: plantas por agrobiolística na ordem – AB-1, AB-2, AB-3, AB-4, AB-5, AB-6; colunas 7 a 12: plantas transformadas inoculação direta com agrobactéria na ordem – ID-1, ID-2, ID-3, ID-4, ID-5, ID-6; C+: plasmídeo pDM8

O promotor é o processador central da regulação de um gene, compreendendo a região 5' da sequência transcrita e contém os sítios de ligação para as RNA polimerases, responsáveis pela transcrição. Atualmente, os promotores mais comumente utilizados em plantas geneticamente modificadas são o promotor do gene *35S* do vírus do mosaico da couve flor (*CaMV35S*), os promotores dos genes que codificam respectivamente a *nopalina sintetase* (*NOS*) e a *octopina sintetase* (*OCS*) de *Agrobacterium tumefaciens* e o promotor do gene de ubiquitina (*Ubi-1*) de milho (HOSHINO, 2007). Apesar dos grandes avanços que têm sido obtidos com o uso desses promotores, os padrões de expressão dos transgenes são variados e baixos em alguns casos (ZHENG; MURAI, 1997; GREEN et al., 2002; SHOU; BORDALLO; WANG, 2004; WU; BIRCH, 2007).

Chowdhury e Vasil (1992) alertaram para a importância do promotor utilizado no plasmídeo, que afeta de forma significativa a eficiência de transformação. Os autores utilizaram o promotor *CaMV35S* para expressar o gene *uid-A* (GUS) em cana-de-açúcar e verificaram uma baixa expressão, quando comparada com trigo e milho. Um resultado similar também foi reportado por Rathus e Birch (1992), que não detectaram expressão GUS após introdução de um plasmídeo contendo o promotor *CaMV35S* em protoplastos de cana-de-açúcar. Gallo-Meagher e Irvine (1993) estudaram os efeitos de quatro tipos de promotores sobre a atividade GUS e chegaram a conclusões similares aos autores já descritos. O promotor *Ubi-1*, mostrou-se superior ao recombinante *Emu*, ao actina 1 de arroz (*Act1*) e ao *CaMV35S*. O uso do promotor *Ubi-1* em transformação genética de monocotiledôneas mostrou aumentar a expressão dos transgenes de interesse (FALCO; TULMANN NETO; ULIAN, 2000).

Nos trabalhos científicos de transformação genética de cana para expressão constitutiva do transgene, observa-se a tendência em usar o promotor *Ubi-1*. Em um estudo utilizando análise de expressão transitória, dois promotores *Ubi* de cana, *Ubi-4* e *Ubi-9*, demonstraram produzir altos níveis de expressão do transgene em calos de algumas espécies incluindo cana e arroz (WEI; ALBERT; MOORE, 1999). Caracterizações adicionais destes promotores mostraram que *Ubi-9* poderia dirigir alta expressão do transgene em arroz transformado, mas não em cana devido ao silenciamento gênico pós-transcricional (WEI et al., 2003).

Como se observa nas Figura 26 e 27, algumas plantas transformadas com pDM9, pDM8 e pNW166 não amplificaram o fragmento esperado do cDNA *AtBI-1*, provavelmente porque não expressam este transgene devido ao silenciamento gênico. O silenciamento é um fenômeno que

ocorre durante ou após a transcrição, sendo que em genes endógenos ocorre predominantemente silenciamento pós-transcricionais.

A expressão do gene é controlada pelas regiões promotoras geralmente localizadas imediatamente antes do gene, que determinam a força, o momento apropriado e a especificidade do tecido para que o gene adjacente se expresse. Algumas vezes, esse controle é influenciado por sequências mais distantes (estimuladores ou silenciadores) ou por fatores mais amplos, como a condensação do sítio do cromossomo onde o transgene foi inserido. Este controle, também pode operar depois, no processo de expressão do gene, por exemplo, sobre a estabilidade do produto proteico do gene (FALCO, 1998). Uma explicação para o silenciamento é que os promotores podem perder algum trecho necessário à expressão do transgene. Para alguns caracteres, há necessidade de promotores mais específicos para certos órgãos ou tecidos do que promotores fortemente constitutivos (FALCO, 1998).

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

Outra explicação para a variação na expressão de um transgene é o efeito de posição e é provavelmente devido à inserção ao acaso do DNA introduzido no genoma. Dependendo do sítio de inserção no genoma, a expressão do transgene pode ser acentuada, suprimida ou desregulada (DE BLOCK, 1993). O DNA cromossomal de eucariotos superiores é organizado em domínio que definem unidades de compactação da cromatina. Um domínio deve corresponder a uma unidade de regulação do gene. Isso pode explicar certos graus de variação na expressão de um transgene entre transformantes independentes. Dependendo do tipo de domínio em que o

transgene é inserido, sua expressão pode ser reduzida por silenciadores, ou intensificada por ativadores.

Problemas com relação ao método de transformação por biolística já foram descritos, principalmente devido à formação de quimeras e frequente integração de várias cópias do transgene ao genoma vegetal, desencadeando processos de silenciamento gênico (BOWER et al., 1996).

A transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* apresenta vantagens em relação ao método direto, resultando geralmente na integração de uma única cópia do transgene no genoma da planta. Além disso, a utilização desse sistema frequentemente permite a obtenção de plantas a partir de uma única célula transformada (ENRIQUEZ-OBREGON et al., 1998).

4.4.3 Análise de *Western Blotting* da proteína AtBI-1 nas plantas transgênicas

As plantas transformadas que foram selecionadas pelo método de RT-PCR foram utilizadas para análise de imunodeteção da proteína AtBI-1-V5His₆ nas folhas destas plantas, utilizando a planta não transformada como controle negativo.

A localização da proteína de interesse foi feita utilizando o anticorpo primário anti-V5 (Invitrogen) que reconhece *V5-His₆ tagged* que está fusionado na posição *downstream* da proteína AtBi-1, e o anticorpo secundário Anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina [*Anti-mouse IgG (whole molecule) – Alkaline Phosphatase, developed in goat*, SIGMA]. Nesta etapa se formou, inicialmente, o complexo antígeno/anticorpo primário, e, em seguida, o anticorpo secundário ligou-se a esse complexo. A fosfatase alcalina conjugada ao anticorpo secundário catalisou o substrato, gerando o produto detectado por quimioluminescência.

Os anticorpos primário e secundário mostraram-se eficientes, possibilitando o reconhecimento da banda da proteína de tamanho esperado de 27 kDa (Figura 28B, 29B e 30B). Os anticorpos foram específicos, não reconhecendo outras bandas na membrana de nitrocelulose.

Paralelamente foram preparados dois géis SDS-PAGE 12% contendo as amostras de proteínas totais extraídas das folhas jovens de plantas de cana transgênicas e da planta não transformada. Um gel foi utilizado para análise de *Western blotting* e o outro gel para a coloração com Coomassie para avaliação do perfil protéico do extrato em PAGE, mostrando que quantidades similares de proteínas foram utilizadas para a imunodeteção de AtBI-1-V5His₆ nas folhas das plantas (Figura 28A, 29A e 30A).

A Figura 28B mostra o ensaio de *Western blotting* realizado com as folhas jovens de plantas transformadas por co-transformação com pDM8 e pHA9, e pDM9 e pHA9. Como se observa, a planta não transformada não apresentou a proteína AtBI-1-V5His₆, diferente das plantas transgênicas que apresentaram diferentes níveis de expressão do transgene que foi transcrito e traduzido em proteína, confirmando o resultado obtido pela análise de RT-PCR (Figura 26).

Figura 28 - Análise de imunodeteção da proteína AtBI-1-V5His₆ nas folhas jovens de plantas transgênicas obtidas por co-transformação, usando o anticorpo primário anti-V5 e o anticorpo secundário Anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina. (A) Aproximadamente 60 µg de proteína total de cada planta foram separadas em SDS-PAGE 12%, mostrando que foram utilizadas quantidades similares de proteínas na imunodeteção. (B) Proteínas transferidas para a membrana de nitrocelulose incubada com os anticorpos primário e secundário. M: Marcador de médio peso molecular; C-: extrato bruto da cana não transformada; colunas 1 a 8: extrato bruto das canas transformadas, na ordem: pDM8-1, pDM8-2, pDM8-3, pDM8-5, pDM9-1, pDM9-2, pDM9-3, pDM9-4

A Figura 29B mostra o ensaio de *Western blotting* realizado com as folhas jovens de plantas transformadas por inoculação direta (ID) dos calos na cultura de *A. tumefaciens* e agrobiolística (AB) com o vetor binário pNW166. Novamente se observa que a planta não transformada não apresentou a proteína AtBI-1-V5His₆, diferente das plantas transgênicas que apresentaram diferentes níveis de expressão do transgene que foi transcrito e traduzido em

proteína, confirmando o resultado obtido através do RT-PCR (Figura 27). Também, verifica-se que algumas das plantas transgênicas que tiveram resultado positivo na análise por RT-PCR do cDNA *AtBI-1* não apresentaram ou apresentaram baixo nível de expressão, indicando possíveis problemas na tradução do transcrito. Isto ocorreu com as plantas ID-3, ID-4 e ID-5, que foram obtidas pela técnica de inoculação direta dos calos na cultura de agrobactéria. Há de se considerar que o promotor que dirige o cDNA *AtBI-1* no vetor binário pNW166 é o *CaMV35S*, que promove baixa expressão em plantas monocotiledôneas.

Figura 29 - Análise de imunodeteção da proteína AtBI-1-V5His₆ em folhas jovens de plantas transgênicas obtidas por transformação via *A. tumefaciens*, usando o anticorpo primário anti-V5 e o anticorpo secundário Anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina. (A) Aproximadamente 60 µg de proteína total de cada planta foram separadas em SDS-PAGE 12%, mostrando que foram utilizadas quantidades similares de proteínas na imunodeteção. (B) Proteínas transferidas para a membrana de nitrocelulose incubada com os anticorpos primário e secundário. M: Marcador de médio peso molecular; C-: extrato bruto da cana não transformada; colunas 1 a 8: extrato bruto das canas transformadas, na ordem: AB-1, AB-3, AB-4, AB-5, AB-6, ID-3, ID-4, ID-5

Para comparar o nível de expressão do cDNA *AtBI-1* entre plantas transgênicas obtidas pelos métodos de biolística e *A. tumefaciens*, realizou-se o *Western blotting* com as seguintes plantas transgênicas: ID-3, ID-5, AB-1, AB-3, pDM8-1, pDM8-2, pDM9-3, pDM9-4. O resultado desta análise está na Figura 30B. A planta não transformada não apresentou a proteína AtBI-1-

V5His₆. As plantas transgênicas apresentaram diferentes níveis de expressão do transgene que foi traduzido em proteína.

Figura 30 - Comparação do nível de expressão da proteína AtBI-1-V5His₆ em folhas jovens de plantas transgênicas obtidas pelos métodos de biolística e *A. tumefaciens*. Análise de imunodeteção usando o anticorpo primário anti-V5 e o anticorpo secundário Anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina. (A) Aproximadamente 20 µg de proteína total de cada planta foram separadas em SDS-PAGE 12%, mostrando que foram utilizadas quantidades similares de proteínas na imunodeteção. (B) Proteínas transferidas para a membrana de nitrocelulose incubada com os anticorpos primário e secundário. M: Marcador de médio peso molecular; C-: extrato bruto da cana não transformada; colunas 1 a 8: extrato bruto das canas transformadas, na ordem: ID-3, ID-5, AB-1, AB-5, pDM8-1, pDM8-2, pDM9-3, pDM9-4

As plantas transgênicas obtidas pelo método de biolística (pDM8-1, pDM8-2, pDM9-3, pDM9-4) apresentaram maiores níveis de expressão, independente do promotor que controla o transgene cDNA *AtBI-1*, comparado com as plantas obtidas pelo método mediado por *A. tumefaciens* (ID-3, ID-5, AB-1, AB-5), que têm o promotor *CaMV35S* controlando a expressão do transgene (Figura 30B).

De acordo com Somers e Makarevitch (2004), a transformação via *Agrobacterium* resulta em perfeita inserção do transgene, frequentemente com a sequência completa e cópia única, em regiões ativamente transcritas e sem causar dano ao genoma. Com base nisto, pode-se supor que os menores níveis de expressão nas plantas transgênicas obtidas por transformação via *A. tumefaciens* (ID-3, ID-5, AB-1, AB-5) também estão relacionados aos menores números de

cópias do transgene no genoma, além do promotor que controla o transgene ser o *CaMV35S*. As plantas transgênicas obtidas pela co-transformação com pDM8, que também tem o promotor *CaMV35S* dirigindo a expressão do transgene, apresentaram maiores níveis de expressão quando comparadas com as plantas transformadas via *A. tumefaciens*. A explicação para isto é que estas plantas provavelmente contêm maiores números de cópias do transgene inseridas no genoma.

As plantas transgênicas obtidas por co-transformação com pDM9, cujo promotor que dirige a expressão do transgene é o *Ubi-1*, apresentaram níveis de expressão similares aos das plantas transgênicas co-transformadas com pDM8.

4.4.4 Análise da integração do DNA pela técnica de *Southern Blot*

Foram selecionadas algumas plantas de cana transgênicas que apresentaram PCR positivo para o gene *neo* e o cDNA do gene *AtBI-1*, e também com os maiores níveis de expressão do transgene nas análises de RT-PCR e *Western blotting*, para análise da integração e estimação do número de cópias do cDNA *AtBI-1* no genoma. Com isto, foi possível associar os níveis de expressão dos transgenes com os números de cópias do mesmo integradas no genoma.

As plantas selecionadas para todas as análises de *Southern blotting*, sendo uma de cada método de transformação, foram: pDM8-1, pDM9-3, ID-3, AB-1.

Para analisar o número de cópias do transgene nas linhagens selecionadas, cada amostra de DNA (aproximadamente 20 µg) foi digerida independentemente com as enzimas *NcoI* e *HindIII* que clivam apenas em um sítio do vetor de transformação. Esta técnica tende a produzir fragmentos de diferentes tamanhos fornecendo uma estimativa do número de cópias inseridas, mas não descarta a possibilidade de rearranjos dentro do transgene ou multimerização dos sítios de inserção (REGISTER III, 1997).

As digestões foram submetidas à eletroforese em géis de agarose 1% (tampão TAE 1x, 3 V.cm⁻¹) com brometo de etídio, juntamente com os controles que foram: as digestões do DNA da planta não transformada com as mesmas enzimas analisadas e o DNA da sonda (0,5 ng) (Figuras 31A e 32A). Como sonda para hibridização, utilizou-se um fragmento de 1000 pb que corresponde a sequência *AtBI-1-V5His₆ :: T-Nos*. Este fragmento foi obtido a partir da digestão do vetor pDM8 ou pDM9 com as enzimas *BamHI* e *EcoRI*.

As Figuras 31B e 32B mostram os diferentes padrões de inserção observados em cada linhagem transgênica. A planta não transformada não apresenta o transgene inserido no genoma.

A hibridização das membranas de *Southern blot* detectou múltiplas bandas nas linhagens transgênicas pDM8-1 e pDM9-3, indicando integração de mais de uma cópia do transgene no genoma. A integração de cópias múltiplas é frequentemente observada após a transformação genética nuclear por biolística (KOHLI et al., 1998; INGELBRECHT; IRVINE; MIRKOV, 1999; FALCO; TULMANN NETO; ULIAN, 2000; ALTPETER et al., 2005; AHMADABADI; RUF; BOCK, 2007). Quando ocorre o disparo, o plasmídeo preparado em sua forma circular na suspensão provavelmente se abre em local inespecífico, e se integra também de forma inespecífica no genoma vegetal. Logo, é difícil precisar o que ocorre em termos de número de cópias e posição de inserção, já que deleções e translocações também são passíveis de ocorrer. Se múltiplas cópias não são desejadas, a estratégia seria a utilização de plasmídeos previamente clivados no preparo das suspensões de disparo, talvez contribuindo para a compreensão dos resultados, produzindo modelos de integração simples (BREITLER et al., 2000; FU et al., 2000; AGRAWAL et al., 2005; ALTPETER et al., 2005; AHMADABADI; RUF; BOCK, 2007).

A utilização de enzimas de restrição que clivam os plasmídeos pDM8 e pDM9 em apenas um sítio de restrição gera fragmentos contendo o transgene com diferentes tamanhos (FALCO, 1998). Isso permite uma estimativa do número de cópias inseridas por genoma, mas não permite informações precisas, já que não há como verificar nesta análise se dentro do fragmento cortado pela enzima há apenas uma cópia do transgene, ou mais cópias alinhadas em diferentes configurações.

Figura 31 - Análise *Southern* para certificação do número de cópias do cDNA *AtBI-1* nas linhagens transgênicas de cana-de-açúcar selecionadas. As amostras de DNA genômico foram digeridas com a enzima de restrição *NcoI*, gerando fragmentos que contêm o transgene. (A) Gel de agarose 1% (tampão TAE 1x, 3 V.cm⁻¹) corado com brometo de etídio contendo o DNA da sonda e amostras de DNA genômico digeridas da planta não transformada e das plantas transgênicas. (B) Filme de raio-X após exposição da membrana de nylon hibridizada com a sonda. L: *1Kb plus DNA ladder*; S: Sonda que é a sequência *AtBI-1-V5His₆::T-Nos* de 1000 pb; colunas C- a 4: DNAs genômicos digeridos com a enzima *NcoI*; C-: planta não transformada; 1: planta transgênica pDM8-1; 2: planta transgênica pDM9-3; 3: planta transgênica ID-3, 4: planta transgênica AB-1

Figura 32 - Análise *Southern* para certificação do número de cópias do cDNA *AtBI-1* nas linhagens transgênicas de cana-de-açúcar selecionadas. As amostras de DNA genômico foram digeridas com a enzima de restrição *HindIII*, gerando fragmentos que contêm o transgene. (A) Gel de agarose 1% (tampão TAE 1x, 3 V.cm⁻¹) corado com brometo de etídio contendo o DNA da sonda e amostras de DNA genômico digeridas da planta não transformada e das plantas transgênicas. (B) Filme de raio-X após exposição da membrana de nylon hibridizada com a sonda. L: *1Kb plus DNA ladder*; S: Sonda que é a sequência *AtBI-1-V5His₆:: T-Nos* de 1000 pb; colunas C- a 4: DNAs genômicos digeridos com a enzima *HindIII*; C-: planta não transformada; 1: planta transgênica pDM8-1; 2: planta transgênica pDM9-3; 3: planta transgênica ID-3, 4: planta transgênica AB-1

No presente trabalho a transformação mediada por *Agrobacterium* levou a obtenção de linhagens transgênicas com menos cópias do cDNA *AtBI-1* integradas nos cromossomos da planta quando comparadas com as linhagens obtidas por biolística, estando de acordo com os resultados de Enriquez-Obregon et al. (1998).

Para analisar a integração do cDNA *AtBI-1* no genoma e confirmar as duas análises de *Southern* anteriormente realizadas com digestões independentes com as enzimas *NcoI* e *HindIII*, procedeu-se a digestão dos DNAs genômicos (20 µg) das linhagens transgênicas selecionadas e da planta não transformada com as enzimas *BamHI* e *EcoRI*, as quais liberaram o fragmento *AtBI-1-V5His₆:: T-Nos* (Figura 33A). Também, foram utilizados como controles da análise de

Southern o DNA da planta não transformada digerido com as mesmas enzimas, o DNA da planta transgênica pDM9-3 não digerido e o DNA da sonda que é o fragmento de 1000 pb que corresponde a sequência *AtBI-1-V5His₆ :: T-Nos*, isolado da digestão de pDM8 ou pDM9 com as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI.

O resultado da análise *Southern* para verificação da integração do cDNA *AtBI-1* no genoma das plantas transgênicas está presente na Figura 33B. Como se observa, a planta não transformada não apresenta o transgene em seu genoma. O DNA genômico da planta transgênica pDM9-3 não digerido, que é um dos controles da análise, ficou concentrado no começo do gel, mostrando que as digestões dos DNAs genômicos com *Bam*HI e *Eco*RI foram completas. O outro controle da análise é a sonda de 1000 pb (*AtBI-1-V5His₆ :: T-Nos*), e verifica-se que as linhagens transgênicas apresentam o mesmo tamanho de fragmento da sonda que corresponde às cópias do transgene inseridas no genoma.

Figura 33 - Análise *Southern* para certificação da presença do cDNA *AtBI-1* nas linhagens transgênicas de cana-de-açúcar selecionadas. As amostras de DNA genômico foram digeridas com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI, liberando o fragmento que corresponde a *AtBI-1-V5His₆ :: T-Nos*. (A) Gel de agarose 1% (tampão TAE 1x, 3 V.cm⁻¹) corado com brometo de etídio contendo o DNA da sonda, DNA genômico não digerido da planta transgênica pDM9-3, e amostras de DNA genômico digeridas da planta não transformada e das plantas transgênicas. (B) Filme de raio-X após exposição da membrana de nylon hibridizada com a sonda. L: 1Kb plus DNA ladder; S: Sonda que é a sequência *AtBI-1-V5His₆ :: T-Nos* de 1000 pb; T: DNA genômico de pDM9-3 não digerido; colunas C- a 4: DNAs genômicos digeridos com as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI; C-: planta não transformada; 1: planta transgênica pDM8-1; 2: planta transgênica pDM9-3; 3: planta transgênica ID-3, 4: planta transgênica AB-1

Com este experimento houve confirmação das análises de *Southern* realizadas com apenas uma enzima (*Nco*I e *Hind*III), pois a linhagem pDM8-1 apresentou a maior intensidade da banda que corresponde ao fragmento *AtBI-1-V5His₆ :: T-Nos* (Figura 33), sugerindo a existência de múltiplas cópias do transgene em seu genoma quando comparada com as outras linhagens transgênicas (Figuras 31B e 32B).

Este resultado corrobora com a análise de *Western blot* que demonstrou que as linhagens pDM8-1 (*CaMV35S :: AtBI-1-V5His₆ :: T-Nos*) e pDM9-3 (*Ubi-1 :: AtBI-1-V5His₆ :: T-Nos*)

apresentaram os maiores níveis de expressão do cDNA *AtBI-1*. Apesar do promotor *CaMV35S* dirigir a expressão do transgene na linhagem pDM8-1, ela contém o maior número de cópias do cDNA *AtBI-1* inseridas no genoma, podendo estar associado ao nível de expressão do transgene.

As linhagens ID-3 e AB-1 apresentaram as menores intensidades da banda que corresponde ao fragmento *AtBI-1-V5His₆ :: T-Nos* (Figura 33B), estando de acordo com os resultados das análises *Southern* com apenas uma enzima (Figuras 31B e 32B). Portanto, as linhagens transgênicas ID-3 e AB-1 obtidas pelo método de transformação via *A. tumefaciens* apresentam menos cópias do transgene no genoma, além dos menores níveis de expressão do cDNA *AtBI-1* (Figura 30) que está sob o controle do promotor *CaMV35S* de baixa expressão em cana-de-açúcar.

Pela análise de *Southern* foi confirmado que as linhagens ID-3 e AB-1 contêm menos cópias do transgene inseridas no genoma do que a linhagem pDM8-1, o que pode ser uma das explicações para o maior nível de expressão do cDNA *AtBI-1* na linhagem transgênica pDM8-1.

4.5 Bioensaio de plantas transgênicas com antibiótico tunicamicina

Para validação da expressão do cDNA *AtBI-1* nas plantas transgênicas de cana-de-açúcar, realizou-se o bioensaio com o indutor de estresse abiótico no retículo endoplasmático (RE), o antibiótico tunicamicina (TM) (Sigma).

A TM é um antibiótico isolado de *Streptomyces lysosuperficus*, caracterizado inicialmente como uma substância com atividade inibidora da proliferação de bactérias, fungos e leveduras. Seu mecanismo de ação está relacionado com a interrupção da síntese do oligossacarídeo durante as primeiras etapas do processo de glicosilação de proteínas. Isto ocorre devido à competição da TM e da N-acetilglicosamina pelo grupo fosfato do carreador dolicol fosfato (HEIFETZ et al., 1979; LEHNINGER et al., 1995). Foi relatado que a TM induziu a morte celular programada em células de plantas (CROSTI et al., 2001; WATANABE; LAM, 2008) e de mamíferos por estímulo do estresse no RE (FUJITA et al., 2002).

Para o bioensaio com a TM foram selecionadas algumas plantas transgênicas que apresentaram maior expressão do cDNA *AtBI-1* nas análises de RT-PCR e *Western blot*, as quais foram:

(a) obtidas pelo método de biolística: pMD8-1 (*CaMV35S :: AtBI-1-V5His₆ :: T-Nos*); pDM9-3 e pDM9-4 (*Ubi-1 :: AtBI-1-V5His₆ :: T-Nos*);

(b) obtidas pelo método mediado por *Agrobacterium tumefaciens* (*CaMV35S :: AtBI-1-V5His₆ :: T-Nos*): ID-3 (Inoculação direta da bactéria nos calos) e AB-1 (Agrobiolística).

Como controle do bioensaio foram utilizadas plantas de cana-de-açúcar não transformadas (Controle), que foram submetidas aos mesmos tratamentos que as plantas transgênicas. Todas as plantas utilizadas no bioensaio estavam com quatro semanas de idade e em meio MSAC sob condições *in vitro*.

Paralelamente foram realizados dois experimentos iguais para aumentar a confiabilidade dos resultados, sendo testados três tratamentos em meio de cultura MS líquido que é o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose e pH 5,8. Os tratamentos realizados foram: T1: controle sem antibiótico TM; T2: 0,5 mg.L⁻¹ de TM filtro-esterilizada; T3: 1,0 mg.L⁻¹ de TM filtro-esterilizada. O número de repetições por tratamento para cada planta foi cinco e como foram realizados dois experimentos, o número de plantas avaliadas por tratamento foi dez.

A fim de caracterizar o fenômeno de morte celular induzida por TM, as plantas de cana-de-açúcar não transformadas e plantas transgênicas que expressam o cDNA *AtBI-1* foram avaliadas quanto ao crescimento do sistema radicular a cada três dias durante dez dias de incubação nos tratamentos, e o conteúdo de clorofila total após doze dias de incubação nos tratamentos.

4.5.1 Avaliação do crescimento do sistema radicular

As plantas selecionadas para o bioensaio, tanto as transgênicas como as não transformadas, foram avaliadas quanto ao comprimento (mm) do sistema radicular antes de serem incubadas nos tratamentos T1, T2 e T3, sendo realizadas três medições por planta. Então elas foram incubadas e mantidas sob fotoperíodo de 20 horas a 27±2°C. As avaliações de alongamento da raiz (mm) foram feitas a cada três dias, e os sintomas característicos de morte celular programada (MCP) foram analisados, observando se havia paralisação do crescimento e/ou necrose do sistema radicular.

Como se observa na Figura 34, houve diferenças nas taxas de alongamento das raízes das plantas transgênicas e não transformadas (Controle) nos diferentes tratamentos com TM. O alongamento dos sistemas radiculares das plantas não transformadas e das plantas transgênicas ID-3 e AB-1 foram comprometidos, havendo paralisação do crescimento a partir do quarto dia

nos tratamentos T2 e T3. Ao contrário, as plantas transgênicas pDM8-1 não foram severamente afetadas no tratamento T2, o que não ocorreu no tratamento T3 quando as raízes das plantas pDM8-1 praticamente não cresceram. No tratamento T2, tanto as plantas transgênicas pDM9-3 como pDM9-4 tiveram alongamento das raízes durante todas avaliações, embora com menores taxas quando comparado com o tratamento T1. Já no tratamento T3, estas mesmas plantas tiveram paralisação do crescimento radicular a partir do quarto dia após a incubação com TM.

Figura 34 - Efeito da TM no alongamento do sistema radicular das plantas não transformadas (Controle) e plantas transgênicas ID-3, AB-1, pDM8-1, pDM9-3 e pDM9-4. Plantas com quatro semanas de idade foram submetidas aos tratamentos T1 (sem TM), T2 (0,5 mg.L⁻¹ TM) e T3 (1,0 mg.L⁻¹ TM) por 10 dias. O comprimento vertical do sistema radicular (mm) foi determinado no 1º, 4º, 7º e 10º dias. Barras e barras de erros representam a média ± desvio padrão de 10 repetições nos 2 experimentos

No décimo dia após a incubação das plantas nos tratamentos, realizou-se a avaliação visual do sistema radicular utilizando lupa. A Figura 35 apresenta os resultados obtidos, sendo possível verificar que a TM causou efeitos drásticos nas plantas não transformadas, assim como nas plantas transgênicas ID-3 e AB-1, mostrando morfologia irregular com inchaço das pontas das raízes no tratamento T2 e morte do sistema radicular no tratamento T3. As plantas transgênicas pDM8-1 também apresentaram inchaço das pontas das raízes, visualizado no tratamento T3. As plantas transgênicas pDM9-3 e pDM9-4 não apresentaram severas

modificações morfológicas nos sistemas radiculares quando comparadas com àquelas que foram afetadas com a presença da TM.

Figura 35 - Fenótipo do sistema radicular das plantas não transformadas (Controle) e plantas transgênicas ID-3, AB-1, pDM8-1, pDM9-3 e pDM9-4 incubadas em meio MS líquido com os tratamentos T1 (sem TM), T2 (0,5 mg.L⁻¹ TM) e T3 (1,0 mg.L⁻¹ TM) e visualizadas na lupa no 10º dia após a incubação

No tratamento T2, em que a concentração de TM era 0,5 mg.L⁻¹, foi possível destacar as plantas que toleraram por mais tempo a condição de estresse abiótico em que foram submetidas. Neste caso, as plantas pDM9-3 e pDM9-4 mostraram suportar a presença do antibiótico, não apresentando alterações morfológicas e necrose do sistema radicular.

As plantas não transformadas, assim como as transgênicas, têm o gene *BI-1* endógeno da cana-de-açúcar (*SoBI-1*, *Saccharum officinarum BI-1*) que é induzido sob condições de estresse. Supõe-se que no tratamento T2 as plantas expressaram o gene *SoBI-1* buscando modular a morte celular para continuar desenvolvendo. Entretanto, as plantas não transformadas e as plantas transgênicas ID-3 e AB-1 tiveram o crescimento radicular paralisado a partir do quarto dia após a incubação com TM no tratamento T2 e os sintomas de morte celular começaram a ficar evidentes.

Sugere-se que a concentração de 1,0 mg.L⁻¹ de TM é letal para todas as plantas analisadas, pois em geral houve paralisação do crescimento das raízes. Nestas condições as plantas se comportaram de maneira diferenciada quanto à absorção de água e nutrientes, havendo àquelas que paralisaram o crescimento do sistema radicular e da parte aérea, paralelamente à ativação dos mecanismos de morte celular. Supõe-se que a expressão dos genes *BI-1*, seja *AtBI-1* ou *BI-1* endógeno (*SoBI-1*), é capaz de modular a morte celular das plantas sob estresse no RE até o momento em que a concentração da TM passa a ser extremamente tóxica e letal.

Portanto, as plantas transgênicas que foram menos afetadas em seu crescimento radicular e fenótipo em presença da TM nos tratamentos T2 e T3 foram pDM9-3 e pDM9-4. Estas plantas transgênicas têm o promotor *Ubi-1* controlando a expressão do cDNA *AtBI-1* (Figura 8) e apresentaram grande acúmulo da proteína AtBI-1-V5His₆ (Figura 30). A planta transgênica pDM9-3 também foi avaliada quanto ao número de cópias do transgene inseridas no genoma pela análise de *Southern* (Figuras 31B, 32B e 33B) e o resultado mostrou que ela contém vários números de cópias do transgene, possivelmente com menor número de inserções do que a planta transgênica pDM8-1 (Figura 33B). As plantas mais afetadas em seu crescimento radicular e fenótipo em presença da TM foram IB-3 e AB-1. Estas plantas transgênicas foram àquelas que apresentaram menor acúmulo de proteína que foi verificado pela técnica de *Western* (Figura 30), podendo estar associado ao promotor *CaMV35S* que controla a expressão do cDNA *AtBI-1* (Figura 6) e também ao menor número de cópias do transgene inseridas no genoma verificado pela análise de *Southern* (Figuras 31B, 32B e 33B). A planta transgênica pDM8-1 foi menos

afetada em seu crescimento radicular e fenótipo em presença da TM comparado com as plantas transgênicas IB-3 e AB-1 em presença do antibiótico TM, sendo que ela apresentou grande acúmulo de proteína verificado pela técnica de *Western* (Figura 30), mesmo tendo o promotor *CaMV35S* controlando a expressão do cDNA *AtBI-1*, o que pode estar associado com o grande número de cópias do transgene inseridas no genoma apresentado pela análise de *Southern* (Figuras 31B, 32B e 33 B). Estes resultados sugerem que o aumento da tolerância a TM nas linhagens transgênicas está correlacionada ao acúmulo da proteína AtBI-1-V5His₆, estando também associado ao promotor que dirige a sua expressão.

Watanabe e Lam (2008) trataram plântulas de *Arabidopsis thaliana* não transformadas com TM e observaram forte inibição do crescimento radicular acompanhada por efeitos de MCP como acumulação de H₂O₂, condensação da cromatina, e fragmentação do DNA nuclear. Segundo estes pesquisadores o acúmulo de H₂O₂ nas células das raízes e brotações das plântulas de *Arabidopsis thaliana* não transformadas tratadas com TM sugere que a perda da viabilidade celular está correlacionada com o estresse oxidativo pelo aumento da produção de H₂O₂, que está frequentemente associado com a MCP em plantas (LAMB; DIXON, 1997).

Várias condições de estresse promovem o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em plantas. Estas moléculas são sinalizadoras do processo de morte celular, mas quando presentes em altas concentrações podem atuar desencadeando desordem na homeostasia da planta por provocar estresse oxidativo (LAMB; DIXON, 1997).

Watanabe e Lam (2008) também avaliaram a expressão do mRNA de *AtBI-1* em presença da TM e observaram que a atividade do promotor aumentou dramaticamente antes de surgirem sintomas de MCP induzida por TM. A indução da expressão de *AtBI-1* por TM é controlada transcricionalmente. Comparado com as plantas controle, dois mutantes *AtBI-1* (*atbi1-1* e *atbi1-2*) exibiram hipersensibilidade ao TM com acelerada progressão à MCP. Portanto, a perda da função de *AtBI-1* resulta na hipersensibilidade das plântulas de *Arabidopsis* ao estresse no RE em mutantes *atbi1*. Ao contrário, estes pesquisadores relataram que a superexpressão de *AtBI-1* reduziu muito a sensibilidade de plântulas de *Arabidopsis* ao TM, confirmando os resultados obtidos com a transformação genética de cana com o cDNA *AtBI-1*. Então, propõe-se que a proteína AtBI-1 apresenta papel importante como um fator de sobrevivência conservado durante o estresse no RE que age em paralelo com o gene endógeno *SoBI-1* nas plantas transgênicas. A

natureza altamente responsiva de expressão de *AtBI-1* ao estresse no RE sugere que este gene tem papel como modulador da MCP mediada pelo estresse no RE nas células das raízes.

4.5.2 Avaliação do conteúdo de clorofila total

O conteúdo de clorofila total foi determinado segundo a metodologia de Lichtenthaler (1987) para todas as plantas incubadas nos tratamentos T1, T2 e T3 após doze dias de incubação. Os sintomas característicos de morte celular programada (MCP) foram analisados, observando se havia clorose e/ou necrose foliar.

A Figura 36 apresenta algumas das plantas avaliadas que representam o fenótipo encontrado após 12 dias de incubação nos tratamentos T1, T2 e T3. Como se observa, enquanto a concentração de 1 mg.L⁻¹ de TM (tratamento T3) induziu a morte do sistema radicular e o aparecimento de clorose com consequentes lesões foliares necróticas nas plantas não transformadas e plantas transgênicas ID-3 e AB-1, a expressão do cDNA *AtBI-1* nas plantas transgênicas pDM8-1, pDM9-3 e pDM9-4 preveniu a morte do sistema radicular e o aparecimento de necrose foliar. Estes fenótipos de morte do sistema radicular, clorose e necrose foliar estão associados com o processo de morte celular.

Figura 36 - Fenótipo das plantas não transformadas (Controle) e plantas transgênicas ID-3, AB-1, pDM8-1, pDM9-3 e pDM9-4 crescidas em meio MS líquido com os tratamentos T1 (sem TM), T2 ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ TM) e T3 ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ TM) após 12 dias de incubação

O resultado obtido para o conteúdo de clorofila total das plantas incubadas nos tratamentos T1, T2 e T3 após doze dias do início do experimento está na Figura 37. É importante considerar que cada coluna presente no gráfico representa a média de dez plantas incubadas em cada tratamento.

Como era de se esperar, as plantas não transformadas tiveram redução no conteúdo de clorofila quando submetidas à maior concentração de TM (tratamento T3). O mesmo resultado foi observado para as plantas transgênicas ID-3 e AB-1. O conteúdo de clorofila total está diretamente associado ao resultado do alongamento do sistema radicular destas plantas. As plantas transgênicas pDM8-1, pDM9-3 e pDM9-4 não variaram o conteúdo de clorofila, o que está relacionado à não existência de clorose foliar nestas plantas quando submetidas ao estresse no RE induzido por TM.

A severidade da MCP induzida por estresse no RE está inversamente correlacionada com os níveis de expressão de *AtBI-1*, indicando que este gene tem um importante papel em manter o crescimento da planta e a sobrevivência sob estresse no RE.

Figura 37 - Efeito da TM no conteúdo de clorofila total das plantas não transformadas (Controle) e plantas transgênicas ID-3, AB-1, pDM8-1, pDM9-3 e pDM9-4 crescidas em meio MS líquido com os tratamentos T1 (sem TM), T2 (0,5 mg.L⁻¹ TM) e T3 (1,0 mg.L⁻¹ TM) após 12 dias de incubação. Barras e barras de erros representam a média $\pm$ desvio padrão de 10 repetições nos 2 experimentos

As moléculas de clorofila são pigmentos de captura de luz para as reações fotoquímicas presentes nos centros de reação dos fotossistemas. Cada centro de reação tem aproximadamente

200-300 moléculas antena, entre clorofilas e carotenóides (TAIZ, ZEIGER, 2004), sendo a clorofila *a* o principal pigmento dos complexos coletores de luz (LHC) em organismos oxigênicos. Um menor conteúdo de clorofilas está relacionado a menor quantidade de membranas nos tilacóides e menor empilhamento nos centros de reação do fotossistema II (FSII) (SANDMANN; SCHEER, 1998). A maior parte dos pigmentos acessórios está presente nos complexos coletores de luz do FSII (LHCII), em especial a clorofila *b* (PAULSEN, 1995).

Em plantas, *BI-1* é induzido por uma variedade de estímulos de estresse tais como ataque de patógeno, estresse oxidativo, e estresse de calor, e sua superexpressão suprime a ativação da morte celular (HÜCKELHOVEN, 2004; WATANABE; LAM, 2004). Potencialmente, estes estresses levam à acumulação de ROS e aumentam o nível de cálcio citosólico em uma célula, resultando na ativação da morte celular (LAM, 2004; HOFIUS et al., 2007). Dada sua localização no RE, que é o maior reservatório de cálcio intracelular e uma organela que é sensível aos estresses externos e internos, *BI-1* pode funcionar por regulação na concentração de cálcio citosólico e/ou estado redox. Até o momento não foram determinadas as funções de *AtBI-1* após a produção de ROS e o mecanismo paralelo que afeta a execução de etapas para a ativação da morte celular mediada pelo estresse no RE.

Os resultados estabeleceram a função de *AtBI-1* como um determinante crítico para a sobrevivência da planta sob estresse no RE. Os mecanismos hipotéticos do envolvimento das proteínas *AtBI-1* e *SoBI-1* nos mecanismos de MCP estão resumidos na Figura 38.

Figura 38 - Hipotético envolvimento das proteínas AtBI-1 e SoBI-1 na regulação da MCP nas canas-de-açúcar transgênicas. A tunicamicina ativa a expressão do *SoBI-1* endógeno, ao passo que *AtBI-1* apresenta expressão constitutiva. Os fatores endógenos e o estresse ambiental podem induzir a MCP. Espécies reativas de oxigênio (ROS), alto nível de Ca⁺² citosólico e a liberação de citocromo c podem induzir a MCP e reações de estresse isoladas ou em combinação entre elas. Finalmente, a MCP depende da atividade proteolítica, que pode ser direta ou indiretamente controlada pela função de AtBI-1 e SoBI-1. Estas proteínas aparentemente trabalham após ou independente da liberação do citocromo c. Sugere-se que a expressão de gene *SoBI-1* pode ser regulada por fatores de estresse e antes dos reguladores da MCP e/ou ativada por um mecanismo que monitora a função mitocondrial, quantidades de ROS e/ou Ca⁺² (Hückelhoven, 2004, modificado)

Os resultados confirmam a hipótese de que a expressão heteróloga do cDNA *AtBI-1* em cana-de-açúcar atenua a indução de vias de morte celular, já que plantas não transformadas foram mais afetadas no crescimento do sistema radicular e no conteúdo de clorofila total quando comparadas às plantas transgênicas pDM8-1, pDM9-3 e pDM9-4.

5 CONCLUSÕES

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

- A transformação genética de cana-de-açúcar, variedade RB835089, é possível pelos métodos de biolística e mediado por *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando calos embriogênicos como explante alvo;
- As sequências de aa das proteínas BI-1 das espécies Poaceae são mais conservadas entre elas do que com relação a AtBI-1 de *A. thaliana*;
- As construções pDM8 e pDM9 desenvolvidas no trabalho permitem a expressão do cDNA do gene *AtBI-1* e o acúmulo da proteína AtBI-1-V5His₆, sendo controlados pelos promotores constitutivos *CaMV35S* e *Ubi-1*, respectivamente;
- Diferentes taxas de eficiência de transformação genética foram obtidas pelo método mediado por *A. tumefaciens*, as quais foram superiores às alcançadas pelo método de biolística;
- O bioensaio com o antibiótico tunicamicina para indução de estresse no retículo endoplasmático confirmou as análises moleculares realizadas com as plantas transgênicas ID-3, AB-1, pDM8-1, pDM9-3 e pDM9-4;
- A expressão heteróloga do cDNA do gene *AtBI-1* em cana-de-açúcar atenuou a indução das vias de morte celular em presença do antibiótico tunicamicina, sendo comprovado pela maior tolerância ao estresse das plantas transgênicas pDM8-1, pDM9-3 e pDM9-4 quando comparadas com as plantas não transformadas que foram afetadas no crescimento do sistema radicular, conteúdo de clorofila total, apresentando sintomas típicos de morte celular programada.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, P.K.; KOHLI, A.; TWYMAN, R.M.; CHRISTOU, P. Transformation of plants with multiple cassettes generates simple transgene integration patterns and high expression levels. **Molecular Breeding**, New York, v. 16, p. 247–260, 2005.
- AHMADABADI, M.; RUF, S.; BOCK, R. A leaf-based regeneration and transformation system for maize (*Zea mays* L.). **Transgenic Research**, New York, v. 16, n. 4, p. 437-448, 2007.
- ALTPETER, F.; BAISAK, H.N.; BEACHY, R.; BOCK, R.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P.; DANIELL, H.; DATTA, K.; DATTA, S.; DIX, P.J.; FAUQUET, C.; HUANG, N.; KOHLI, A.; MOOIBROEK, H.; NICHOLSON, L.; NGUYEN, T.T.; NUGENT, G.; RAEMAKERS, K.; ROMANO, A.; SOMERS, D.A.; STOGER, E.; TAYLOR, N.; VISSER R. Particle bombardment and the genetical enhancement of crops: myths and realities. **Molecular Breeding**, New York, v. 15, p. 305-327, 2005.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ARENCIBIA, A.; MOLINA, P.; DE LA RIVA, G.; SELMAN-HOUSSEIN, G. Production of transgenic sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by intact cell electroporation. **The Plant Cell Reports**, New York, v. 14, p. 305-309, 1995.
- ARENCIBIA, A.; MOLINA, P.; GUTIERREZ, C.; FUENTES, A.; GREENIDGE, V.; MENENDEZ, E.; DE LA RIVA, G.; SELMAN-HOUSSEIN, G. Regeneration of transgenic sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants from intact meristematic tissue transformed by electroporation. **Biotechnologia Aplicada**, La Habana, v. 9, p. 156-165, 1992.
- ARENCIBIA, A.; VÁZQUEZ, R.; PRIETO, D.; TÉLLEZ, P.; CARMONA, E.; COEGOI, A.; HERNANDEZ, L.; DE LA RIVA, G.; SELMAN-HOUSSEIN, G. Transgenic sugarcane plants resistant to stem borer attack. **Molecular Breeding**, New York, v. 3, p. 247-255, 1997.
- ARENCIBIA, A.D. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp. L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Transgenic Research**, New York, v. 7, p. 213-222, 1998.
- ARENCIBIA, A.; CARMONA, E.; TELLEZ, P.; CHAN, M-T.; YU, S.; TRUJILLO, L.E.; ORAMAS, P. Transgenic sugarcane plants resistant to stem borer attack. **Molecular Breeding**, New York, v. 3, n. 4, p. 247-255, 1997.
- BABAEIZAD, V.; IMANI, J.; KOGEL, K.H.; EICHMANN, R.; HÜCKELHOVEN, R. Over-expression of the cell death regulator BAX inhibitor-1 in barley confers reduced or enhanced susceptibility to distinct fungal pathogens. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 118, p. 455-463, 2009.

BAEK, D.; NAM, J.; KOO, Y.D.; KIM, D.H.; LEE, J.; JEONG, J.C.; KWAK, S.S.; CHUNG, W.S.; LIM, C.O.; BAHK, J.D.; HONG, J.C.; LEE, S.Y.; KAWAI-YAMADA, M.; UCHIMIYA, H.; YUN, D.J. Bax-induced cell death of *Arabidopsis* is mediated through reactive oxygen-dependent and -independent processes. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 56, p. 15-27, 2004.

BARBIERI, V.; VILLA NOVA, N.A. . Climatologia. In: _____. **Climatologia e a cana-de-açúcar**. Araras: PLANALSUCAR, Coordenadoria Regional Sul – COSUL, 1977. p. 1-22.

BEERS, E.P.; McDOWELL, J.M. Regulation and execution of programmed cell death in response to pathogens, stress and developmental cues. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, p. 561–567, 2001.

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

BIRCH, R.G.; MARETZKI, A. Transformation of sugarcane. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Plant protoplasts and genetic engineering. IV. Biotechnology in agriculture and forestry**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1993. v. 23, p. 348–360.

BIRCH, R.G.; BOWER, R.; ELLIOTT, A.; POTIER B.; FRANKS, T.; CORDEIRO, G. Expression of foreign genes in sugarcane. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS, 22., 1995, Cali. **Proceedings...** Cali: Tecnicaña, 1995. v. 2, p. 369–373.

BOLDUC, N.; BRISSON, L.F. Antisense down regulation of *NtBI-1* in tobacco BY-2 cells induces accelerated cell death upon carbon starvation. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 532, p. 111-114, 2002.

BOLDUC, N.; LAMB, G.N.; CESSNA, S.G.; BRISSON, L.F. Modulation of Bax Inhibitor-1 and cytosolic Ca^{2+} by cytokinins in *Nicotiana tabacum* cells. **Biochimie**, Paris, v. 89, p. 961-971, 2007.

BOLDUC, N.; OUELLET, M.; PITRE, F.; BRISSON, L.F. Molecular characterization of two plant *BI-1* homologues which suppress Bax-induced apoptosis in human 293 cells. **Planta**, Berlin, v. 216, p. 377-386, 2003.

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

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

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

BRAGA, D.P.V.; ARRIGONI, E.D.B.; SILVA-FILHO, M.C.; ULIAN, E.C. Expression of the Cry1Ab protein in genetically modified sugarcane for the control of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of New Seeds**, West Hazleton, v. 5, p. 209-222, 2003.

BRASILEIRO, A.C.M. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1998. 309 p.

BRASILEIRO, A.C.M.; DUSI, D.M.A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J. B. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, SPI; EMBRAPA, CNPH, 1999. 863 p. v. 2.

BREITLER, J.C.; LABEYRIE, A.; MEYNARD, D.; LEGAVRE, T.; GUIDERDONI, E. Efficient microprojectile bombardment-mediated transformation of rice using gene cassettes. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 104, p. 709-719, 2002.

BULL, T. The sugarcane plant. In: HOGARTH, M, ALLSOPP, P. (Ed.). **Manual of cane growing**. Indooroopilly: Bureau of Sugar Experimental Stations, 2000. p. 71-83.

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

CESNIK, R.; MIOCQUE, J. **Melhoramento da cana-de-açúcar**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. 307 p.

CHAE, H.J.; NING, K.E.; KIM, H.-R.; SHAORONG, C.; GODZIK, A.; DICKMAN, M. REED, J.C. Evolutionarily conserved cytoprotection provided by *Bax inhibitor-1* homologs from animals, plants, and yeast. **Gene**, Amsterdam, v. 323, p. 101-113, 2003.

CHAE, H.J.; KIM, H.R.; XU, C.; BAILLY-MAITRE, B.; KRAJEWSKA, M.; KRAJEWSKI, S.; BANARES, S.; CUI, J.; DIGICAYLIOGLU, M.; KE, N.; KITADA, S.; MONOSOV, E.; THOMAS, M.; KRESS, C.L.; BABENDURE, J.R.; TSIEN, R.Y.; LIPTON, S.A.; REED, J.C. BI-1 regulates an apoptosis pathway linked to endoplasmic reticulum stress. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 15, p. 355-366, 2004.

CHEN, P.H.; LIN, M.J.; XUE, Z.P.; CHEN, R.K.A. Study on genetic transformation of GNA gene in sugarcane. **Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis**, Beijing, v. 26, n. 5, p. 740-748, 2004.

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

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

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

CHICHKOVA, N.V.; KIM, S.H.; TITOVA, E.S.; KALKUM, M.; MOROZOV, V.S.; RUBTSOV, Y.P.; KALININA, N.O.; TALIANSKY, M.E.; VARTAPETIAN, A.B. A plant caspase-like protease activated during the hypersensitive response. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 16, p. 157-171, 2004.

CHOWDHURY, M.K.U.; VASIL, I. Stably transformed herbicide resistant callus of sugarcane via microprojectile bombardment of cell suspension cultures and electroporation of protoplasts. **The Plant Cell Reports**, New York, v. 11, p. 494-498, 1992.

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

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/>>. Acesso em: 19 jan. 2009.

COSTA, M.D.B.L. **Estresse osmótico e do retículo endoplasmático induzem morte celular programada de maneira independente das proteínas NRPs**. 2007. 92 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2007.

COUPE, S.A.; WATSON, L.M.; RYAN, D.J.; PINKNEY, T.T.; EASON, J.R. Molecular analysis of programmed cell death during senescence in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica oleracea*: cloning broccoli LSD1, Bax inhibitor and serine palmitoyltransferase homologues. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, p. 59-68, 2004.

CROSTI, P.; MALERBA, M.; BIANCHETTI, R. Tunicamycin and brefeldin A induce in plant cells a programmed cell death showing apoptotic features. **Protoplasma**, Leipzig, v. 216, p. 31-38, 2001.

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

DANON, A.; DELORME, V.; MAILHAC, N.; GALLOIS, P. Plant programmed cell death: a common way to die. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 38, n. 9, p. 647-655, 2000.

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

DEL POZO, O.; LAM, E. Expression of the baculovirus p35 protein in tobacco affects cell death progression and compromises N gene-mediated disease resistance response to tobacco mosaic virus. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 16, p. 485-494, 2003.

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

DESHMUKH, S.; HÜCKELHOVEN, R.; SCHÄFER, P.; IMANI, J.; SHARMA, M.; WEISS, M.; WALLER, F.; KOGEL, K.-H. The root endophytic fungus *Piriformospora indica* requires host cell death for proliferation during mutualistic symbiosis with barley. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, p. 18450–18457, 2006.

D'HONT, A.; GLASZMANN, J.C. Unravelling the genome structure of polyploids using FISH and GISH; examples of sugarcane and banana. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 109, n. 1/3, p. 27-33, 2005.

DICKMAN, M.B.; PARK, Y.K.; OLTERSODORF, T.; LI, W.; CLEMENTE, T.; FRENCH, R. Abrogation of disease development in plants expressing animal antiapoptotic genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, p. 6957-6962, 2001.

DONG, Q.; LAWRENCE, C.J.; SCHLUETER, S.D.; WILKERSON, M.D.; KURTZ, S.; LUSHBOUGH, C.; BRENDDEL, V. Comparative Plant Genomics Resources at PlantGDB. **Plant Physiology**, Rockville, v. 139, p. 610-618, 2005.

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

EICHMANN, R.; SCHULTHEISS, H.; KOGEL, K.-H.; HÜCKELHOVEN, R. The barley apoptosis suppressor homologue *Bax inhibitor-1* compromises nonhost penetration resistance of barley to the inappropriate pathogen *Blumeria graminis* f. sp. tritici. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 17, p. 484–490, 2004.

ELLIOTT, A.R. Direct regeneration of transgenic sugarcane following microprojectile transformation of regenerable cells in thin transverse section explants. In: VASIL, I.K. (Ed.). **Proceedings of Xth International Association of Plant Tissue Culture and Biotechnology**. Orlando, 2002, Abstract P-1376.

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

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

ENRIQUEZ-OBREGON, G.A.; VÁZQUEZ-PADRÓN, R.I.; PRIETO-SAMSONOV, D.L.; DE LA RIVA, G.A.; SELMAN-HOUSSEIN, G. Herbicide resistant sugarcane (*Saccharum*

officinarum) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. **Planta**, Berlin, v. 206, p. 20-27, 1998.

ENRIQUEZ-OBREGON, G.A.; VÁZQUEZ-PADRÓN, R.I.; PRIETO-SAMSÓNOV, D.L.; PEREZ, M.; SELMAN-HOUSSEIN, G. Genetic transformation of sugarcane by *Agrobacterium tumefaciens* using antioxidant compounds. **Biotecnologia Aplicada**, La Habana, v. 14, p. 169-174, 1997.

FALCO, M.C. **Transformação de cana-de-açúcar para resistência ao herbicida glufosinato de amônio, via biolística**. 1998. 129 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 1998.

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

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

FAO. Disponível em: <<http://apps.fao.org>>. Acesso em: 22 jan. 2009.

FELIX, J.M. **Análise da expressão gênica envolvida no metabolismo de sacarose em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. 2006. 162 p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

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

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

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

FITCH, M.; CHANG, V.; PERLAK, F.; CRUZ, A.D.; OTA, A.; MOORE, P. Sugarcane transformation with a B.t. gene for resistance to the lesser cornstalk borer. In: **Plant and Animal Genome V Conference**, San Diego, 1996.

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

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

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

FUJITA, E.; KOUROKU, Y.; JIMBO, A.; ISOAI, A.; MARUYAMA, K.; MOMOI, T. Caspase-12 processing and fragment translocation into nuclei of tunicamycin-treated cells. **Cell Death and Differentiation**, London, v. 9, p. 1108–14, 2002.

GALLO-MEAGHER, M.; IRVINE, J.E. Herbicide resistant transgenic sugarcane plants containing the *bar* gene. **Crop Science**, Madison, v. 36, n. 5, p. 1367–1374, 1996.

GALUN, E. RNA silencing in plants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Oxon, v. 41, n. 2, p. 113–123, 2005.

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

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

GARCIA, A.A.; KIDO, E.A.; MEZA, A.N.; SOUZA, H.M.B.; PINTO, L.R.; PASTINA, M.M.; LEITE, C.S.; DA SILVA, J.A.G.; ULIAN, E.C.; FIGUEIRA, A.; SOUZA, A.P. Development of an integrated genetic map of a sugarcane (*Saccharum* spp.) commercial cross, based on a maximum-likelihood approach for estimation of linkage and linkage phases. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 112, n. 2, p. 298–314, 2006.

GASCHO, G.J.; SHIH, S. F. Sugarcane. In: TEARE, I.D.; PEET, M.M. (Ed.). **Crop-water relations**. New York: John Wiley, 1983. p. 445–479.

GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G.-J. **Plant propagation by tissue culture** 3rd ed. Amsterdam: The Background Springer, 2008. v. 1, 501 p.

GHOSHROY, S.; LARTEY, R.; SHENG, J.; CITOVSKY, V. Transport of proteins and nucleic acids through plasmodesmata. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 24–48, 1997.

GILCHRIST, D.G. Programmed cell death in plant disease: the possible and promise of cellular suicide. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, p. 393–414, 1998.

GREEN, J.; VAIN, P.; FEARNEHOUGH, M.T.; WORLAND, B.; SNAPE, J.W.; ATKINSON, H.J. Analysis of the expression patterns of the *Arabidopsis thaliana* tubulin-1 and *Zea mays*

ubiquitin-1 promoters in rice plants in association with nematode infection. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 60, p. 197-205, 2002.

GREENBERG, J.T. Programmed cell death: A way of life for plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, p. 12094-12097, 1996.

GROSS, A.; McDONNELL, J.M.; KORSMEYER, S.J. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. **Genes and Development**, New York, v. 13, p. 1899-1911, 1999.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, New York, v. 41, p. 95-98, 1999.

HARA-NISHIMURA, I.; HATSUGARI, N.; NAKAUNE, S.; KUROYANAGI, M.; NISHIMURA, M. Vacuolar processing enzyme: an executor of plant cell death. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 8, p. 404-408, 2005.

HATSUGAI, N.; KUROYANAGI, M.; NISHIMURA, M.; HARA-NISHIMURA, I. A cellular suicide strategy of plants: vacuole-mediated cell death. **Apoptosis**, Amsterdam, v. 11, p. 905-911, 2006.

HAUPTMANN, R.M.; VASIL, V.; OZIAS-AKINS, P.; TABAEIZADEH, Z.; ROGERS, S.G.; FRALEY, R.T.; HORSCH, R.B.; I.K.VASIL. Evaluation of Selectable Markers for Obtaining Stable Transformants in the Gramineae. **Plant Physiology**, Rockville, v. 86, p. 602-606, 1988.

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

HEIFETZ, A.; KEENAN, R.W.; ELBEIN, A.D. Mechanism of action of tunicamycin on the UDPGlcNAc: Dolichyl-Phosphate GlcNAc-1-Phosphate transferase. **Biochemistry**, Washington, v. 18, n. 11, p. 2186-2192, 1979.

HEINZ, D.J.; KTISHNAMURTHI, M.; NICKELL, L.G.; MARETZKI, A. Cell, tissue and organ culture in sugarcane improvement. In: REINERT, J.; BAJAJ, V.P.S. (Ed.). **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture**. Berlin: Springer Verlag, 1977. p. 3-17.

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

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

HOEBERICHTS, F.A.; WOLTERING, E.J. Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plantspecific regulators. **Bioessays**, Cambridge, v. 25, p. 47-57, 2003.

HOFIUS, D.; TSITSIGIANNIS, D.I.; JONES, J.D.; MUNDY, J. Inducible cell death in plant immunity **Seminars in Cancer Biology**, New York, v. 17, p. 166–187, 2007.

HOLLIEN, J.; WEISSMAN, J.S. Decay of endoplasmic reticulum localized mRNAs during the unfolded protein response. **Science**, Washington, v. 313, p. 104-107, 2006.

HOSHINO, A.A. **Isolamento e caracterização de promotores tecido-específicos a partir das informações do SUCEST (“Sugarcane Expressed Sequence Tags”)**. 2007. 143 p. Tese (Doutorado em Genética)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu. 2007.

HSIAO, T.C. Plant responses to water stress. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 24, p. 519-570, 1973.

HÜCKELHOVEN, R. BAX Inhibitor-1, an ancient cell death suppressor in animals and plants with prokaryotic relatives. **Apoptosis**, Amsterdam, v. 9, p. 299–307, 2004.

HÜCKELHOVEN, R.; DECHERT, C.; KOGEL, K.-H. Overexpression of barley BAX inhibitor-1 induces breakdown of mlo-mediated penetration resistance to *Blumeria graminis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, p. 5555-5560, 2003.

HÜCKELHOVEN, R.; DECHERT, C.; TRUJILLO, M.; KOGEL, K.-H. Differential expression of putative cell death regulator genes in nearisogenic, resistant and susceptible barley lines during interaction with the powdery mildew fungus. **Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p. 739–748, 2001.

HUNOLD, R.; BRONNER, R.; HARNER, G. Early events in microprojectile bombardment: cell viability and particle location. **The Plant Journal**, Oxford, v. 5, n. 4, p. 593-604, 1994.

IHARA-OHORI, Y. Cell death suppressor *Arabidopsis Bax Inhibitor-1* is associated with calmodulin binding and ion homeostasis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 143, p. 650-660, 2007.

INGELBRECHT, I.L.; IRVINE, J.E.; MIRKOV, T.E. Posttranscriptional gene silencing in transgenic sugarcane. Dissection Of homology-dependent virus resistance in a monocot that has a complex polyploid genome. **Plant Physiology**, Rockville, v. 119, n. 4, p. 1187-1198, 1999.

IRVINE, J.E. The frequency of marker change in sugarcane plants regenerated from callus culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 3, n. 3, p.201-209. 1984.

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

JAMES, C. **Relatório 35:** Situação Global das Lavouras GM (GM) Comercializadas; 2006. Rio de Janeiro: International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, 2006. 107 p.

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

JELITTO-VAN DOREN, E.P.W.M.; VIDAL, S.; DENECKE, J. Anticipating endoplasmic reticulum stress: a novel early response before pathogenesis-related gene induction. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 11, p. 1935-1943, 1999.

JIN, C.; REED, J.C. Yeast and apoptosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 3, p. 453-459, 2002.

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

JOYCE, P.A.; McQUALTER, R.B.; HANDLEY, J.A.; DALE, J.L.; HARDING, R.M.; SMITH, G.R. Transgenic sugarcane resistant to sugarcane mosaic virus. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technology**, Queensland, v. 20, p. 204-210, 1998b.

JÜRGENSMEIER, J.M.; KRAJEWSKI, S.; ARMSTRONG, R.C.; WILSON, G.M.; OLTERS DORF, T.; FRITZ, L.C.; REED, J.C.; OTTILIE, S. Bax- and Bak-induced cell death in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 8, p. 325-339, 1997.

KAWAI, M.; PAN, L.; REED, J.C.; UCHIMIYA, H. Evolutionally conserved plant homologue of the *Bax inhibitor-1* (BI-1) gene capable of suppressing Bax-induced cell death in yeast. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 464, p. 143-147, 1999.

KAWAI-YAMADA, M.; OHMORI, Y.; UCHIMIYA, H. Dissection of *Arabidopsis* Bax inhibitor-1 suppressing Bax-, hydrogen peroxide-, and salicylic acid-induced cell death. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 16, p. 21-32, 2004.

KAWAI-YAMADA, M.; JIN, L.; UOSHINAGA, K.; HIRATA, A.; UCHIMIYA, H. Mammalian Bax-induced plant cell death can be down-regulated by overexpression of *Arabidopsis* *Bax inhibitor-1* (*AtBI-1*). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, p. 12295-12300, 2001.

KAWAI-YAMADA, M.; SAITO, Y.; JIN, L.; OGAWA, T.; KIM, K.M.; YU, L.H.; TONE, Y.; HIRATA, A.; UMEDA, M.; UCHIMIYA, H. A novel *Arabidopsis* gene causes BAX-like lethality in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 280, n. 47, p. 39468-39473, 2005.

KIM, M.C.; PANSTRUGA, R.; ELLIOTT, C.; MÜLLER, J.; DEVOTO, A.; YOON, H.W.; PARK, H.C.; CHO, M.J.; SCHULZE-LEFERT, P. Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defense against mildew in barley. **Nature**, Washington, v. 416, p. 447-450, 2002.

KLEIN, T.M.; GRADZILE, T.; FROMM, M.E.; SANFORD, J.C. Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high velocity of microprojectiles. **Nature Biotechnology**, New York, v. 6, p. 559-563, 1987.

KOHLI, A.; LEECH, M.; VAIN, P.; LAURIE, D.A.; CHRISTOU, P. Transgene organization in rice engineered through direct DNA transfer supports a two-phase integration mechanism mediated by the establishment of integration hot-spots. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, V. 95, P. 7203-7208, 1998.

KOONIN, E.V.; ARAVIND, L. Origin and evolution of eukaryotic apoptosis: the bacterial connection. **Cell Death and Differentiation**, London, v. 9, p. 394-404, 2002.

KOZUTSMI, Y.; SEGAL, M.; NORMINGTON, K.; GETHING, M.J.; SAMBROOK, J. The presence of malformed proteins in the endoplasmic-reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. **Nature**, Washington, v.332, p.462-464, 1988.

KRISHNAMURTHY, K.V.; KRISHNARAJ, R.; CHOZHAVENDAN, R.; CHRISTOPHER, F.S. The program of cell death in plants and animals: a comparison. **Current Science**, Bangalore, v. 79, p. 1169-1181, 2000.

KROEMER, G.; REED, J.C. Mitochondrial control of cell death. **Nature Medicine**, New York, v. 6, p. 513-519, 2000.

LACOMME, C.; SANTA CRUZ, S. Bax-induced cell death in tobacco is similar to hypersensitive response. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, p. 7956-9061, 1999.

LAKSHMANAN, P. Somatic embryogenesis in sugarcane - An addendum to the invited 2005 review of 'Sugarcane Biotechnology: the challenges and opportunities'. **In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Oxon, v. 42, p. 201-205, 2006.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R.J.; AITKEN, K.S.; GROF, C.L.P.; BONNETT, G.D.; SMITH, G.R. Sugarcane Biotechnology: the Challenges and Opportunities. **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, Gaithersburg, v. 41, p. 345-363, 2005.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R.J.; ELLIOTT, A.R.; WANG, L. F.; MCKEON, M.G.; SWAIN, R.S.; BORG, Z.; BERDING, N.; GROF, C.P.L.; SMITH, G.R. . Direct regeneration tissue culture and transformation systems for sugarcane and other monocot species. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGY MOLECULAR BIOLOGY WORKSHOP. 2003, Montpellier. **Proceedings...** v. 4, p. 25.

LAM, E. Controlled cell death, plant survival and development. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 5, p. 305-315, 2004.

LAM, E.; KATO, N.; LAWTON, M. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. **Nature**, Washington, v. 411, p. 848-853. 2001.

LAMB, C.; DIXON, R.A. The oxidative burst in plant disease resistance **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 251–275, 1997.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Principles of biochemistry**. 2nd ed. New York: Worth Publishers, 1995. 695 p.

LEIBBRANDT, N.B.; SNYMAN, S.J. Stability of gene expression and agronomic performance of a transgenic herbicide-resistant sugarcane line in South Africa. **Crop Sciences**, Madison, v. 43, n. 2, p. 671-677, 2003.

LEMASTERS, J.L. Mechanisms of hepatic toxicity.V. Necrapoptosis and mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. **American Journal of Physiology**, Baltimore, v. 276, p. 1–6, 1999.

LI, K.-G.; PAN, D.-R.; XU, L.-P. The study on transformation of LEAF gene into sugarcane by particle bombardment. **Acta Agronomica Sinica**, Palmira, v.29, p. 541-544, 2003.

LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: PACKER, L.; DOUCE, R. (Ed.). **Methods in enzymology**. London: Academic Press, 1987. v. 148, p. 350-381.

LINCOLN, J.E.; RICHAEEL, C.; OVERDUIN, B.; SMITH, K.; BOSTOCK, R.; GILCHRIST, D.G. Expression of the antiapoptotic baculovirus *p35* gene in tomato blocks programmed cell death and provides broad-spectrum resistance to disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, p. 15217–15221, 2002.

LIU, M.C. Factors affecting induction, somatic embryogenesis and plant regeneration of callus from cultured immature inflorescence of sugarcane. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 141, p. 714-720, 1993.

MACEDO, I.C. **A energia da cana-de-açúcar: doze estudos sobre a agroindústria da cana-de-açúcar no Brasil e a sua sustentabilidade**. São Paulo: Berlendis & Vertecchia; UNICA, 2005. 237 p.

MADEO, F.; HERKER, E.; WISSING, S.; JUNGWIRTH, H.; EISENBERG, T.; FRÖHLICH, K.U. Apoptosis in yeast. **Current Opinion in Microbiology**, New York, v. 7, p. 655–660, 2004.

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

MARGIS-PINHEIRO, M.A.; SANDRONI, M.; LUMMERZHEIM, M.; OLIVEIRA, D.E. A defesa das plantas contra as doenças. **Ciência Hoje**, p. 147, março de 1999.

MATSUMURA, H.; NIRASAWA, S.; KIBA, A.; URASAKI, N.; SAITOH, H.; ITO, M.; KAWAI-YAMADA, M.; UCHIMIYA, H.; TERAUCHI, R. Overexpression of *Bax inhibitor*

suppresses the fungal elicitor-induced cell death in rice (*Oryza sativa* L.) cells. **The Plant Journal**, Oxford, v. 33, p. 425–434, 2003.

MATSUOKA, H.; MAKI, N.; YOSHIDA, S.; ARAI, M.; WANG, J.; OIKAWA, Y.; IKEDA, T.; HIROTA, N.; NAKAGAWA, H. ISHII, A. A mouse model of the atopic eczema/dermatitis syndrome by repeated application of a crude extract of house-dust mite *Dermatophagoides farinae*. **Allergy**, Copenhagen, v. 58, p. 139–145, 2003.

MENOSSE, M.; SILVA-FILHO, M.C.; VINCENTZ, M.; VAN-SLUYS, M.-A.; SOUZA, G.M. Sugarcane functional genomics: gene discovery for agronomic trait development. **International Journal of Plant Genomics**, New York, v. 458732, p. 1-11, 2008.

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

MING, R.; SIN-CHIEH, L.; MOORE, P.H.; IRVINE, J.E.; PATERSON, A.H. QTL analysis in a complex autopolyploid: Genetic control of sugar content in sugarcane. **Genome Research**, Woodbury, v. 11, p. 2075-2084, 2001.

MITSUHARA, I.; MALIKA, K.A.; MIURA, M.; OHASHI, Y. Animal cell death suppressors Bcl-x(L) and Ced-9 inhibit cell death in tobacco plants. **Current Biology**, London, v. 15, p. 775–778, 1999.

MOORE, P.H. Progress and development in sugarcane biotechnology. **Proceedings of International Society of Sugar Cane Technology**. New Delhi, v. 23, p. 241–258, 1999.

MULLER, A.E. Applications of RNA interference in transgenic plants. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, New York, v. 1, n. 024, p. 13, 2006.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 15, n. 3, p. 473-479, 1962.

NAGANO, M.; IHARA-OHORI, Y.; IMAI, H.; INADA, N.; FUJIMOTO, M.; TSUTSUMI, N.; UCHIMIYA, H.; KAWAI-YAMADA, M. Functional association of cell death suppressor, *Arabidopsis Bax Inhibitor-1*, with fatty acid 2-hydroxylation through cytochrome b. **The Plant Journal**, Oxford, 2009. in press.

NEHARA, N.S.; CHIBBAR, R.N.; LEUNG, N.; CASWELL, K.; MALLARD, C.; STEINHAUSER, L.; BAGA, M.; KARTHA, K.K. Self-fertile transgenic wheat plants regenerated from isolated scutellar tissues from microprojectile bombardment with two distinct genes constructs. **The Plant Journal**, Oxford, v. 5, p. 285-297, 1994.

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

NOGUEIRA, F.T.S. **Identificação e caracterização de genes expressos em resposta ao estresse por baixa temperatura em cana-de-açúcar**. 127 p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

NUTT, K.A. **Characterisation of proteinase inhibitors from canegrubs for possible application to genetically engineer pest-derived resistance into sugarcane**. 2005. 206 p. PhD (Doctor of Philosophy) - Queensland University of Technology, Brisbane, 2005.

NUTT, K.A.; ALLSOPP, P.G.; MCGHIE, T.K.; SHEPHERD, K.M.; JOYCE, P.A. Transgenic sugarcane with increased resistance to canegrubs. In: CONFERENCE OF THE AUSTRALIAN SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 1999, Townsville. **Proceedings...** Townsville: PK Editorial Services, 1999. p. 27-30.

ODA, Y.; HOSOKAWA, N.; WADA, I.; NAGATA, K. EDEM as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin. **Science**, Washington, v. 299, p. 1394–1397, 2003.

OGER, P.; PETIT, A.; DESSAUX, Y. Genetically engineered plants producing opines alter their biological environment. **Nature Biotechnology**, New York, v. 15, p. 369-372, 1997.

OROPEZA, M.; DE GARCIA, E. Somaclonal variants resistant to sugarcane mosaic virus and their agronomic characterization. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Oxon, v. 32, p. 26–30, 1996.

ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B.; NICOTERA, P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 4, p. 552–565, 2003.

PALLAVAN-UNSAL, N.; BUYUKTUNCER, E.; TUFEKCI, M.A. Programmed cell death in plants. **The Plant Journal for Cell and Molecular Biology**, Oxford, v. 4, p. 9-23, 2005.

PAULSEN, H. Chlorophyll a/b-binding proteins. **Photochemistry and Photobiology**, Washington, v. 62, p. 367-382, 1995.

PENNEL, R.I.; LAMB, C. Programmed Cell death in plants. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 9, p. 1157-1168, 1997.

PIFFANELLI, P.; ZHOU, F.; CASAIS, C.; ORME, J.; JAROSH, B.; SCHAFFRATH, U.; COLLINS, N.C.; PANSTRUGA, R.; SCHULZE-LEFERT, P. The barley MLO modulator of defense and cell death is responsive to biotic and abiotic stress stimuli. **Plant Physiology**, Rockville, v. 129, p. 1076-85, 2002.

QUECINI, V.M.; VIEIRA, M.L.C. Plantas transgênicas. In: SERAFINI, L.A.; NEIVA MONTEIRO DE BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001. p. 278-331.

RANGEL, P.; GOMEZ, L.; VICTORIA, J.I.; ANGEL, F. Transgenic plants of CC 84-75 resistant to the virus associated with the sugarcane yellow leaf syndrome In: SILVER JUBILEE CONGRESS, n. 4, 2003, Guatemala. Proceedings of International Society of Sugar Cane Technology, Molecular Biology Workshop, Montpellier: Editorial Services, 2003, p. 30.

RASCO-GAUNT, S.; RILEY, A.; BARCELO, P.; LAZZERI, P.A. Analysis of particle bombardment parameters to optimize DNA delivery into wheat tissues. **The Plant Cell Reports**, New York, v. 19, p. 118-127, 1999.

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

REAM, W.; GELMIN, S.B. **Crow gall**: advances in understanding interkingdon gene transfer. Saint Paul: APS Press, 1996. 148 p.

REAPE, T.J.; McCABE, P.F. Apoptotic-like programmed cell death in plants. **New Phytologist**, London, v. 180, p. 13-26, 2008.

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

RIBEIRO, C.W. **Estabelecimento de uma cana-de-açúcar transgênica superexpressando o gene da canacistatina (CaneCPI-1), uma proteína inibidora de cisteíno-protease**. 2007. 98 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.

ROACH, B.T. Origin and improvement of the genetic base of sugarcane. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technology**, Queensland, p. 34-47, 1989.

RON, D.; WALTER, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 8, p. 519-529, 2007.

RYALS, J., UKNES, S.; WARD, E. Systemic acquired resistance. **Plant Physiology**, Rockville, v. 104, p. 1109-1112, 1994.

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

SAMBROK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. 545p.

SANCHEZ, P.; TORRES ZEBALA; M.; GRANT; M. AtBI-1, a plant homologue of Bax inhibitor-1, suppresses Bax-induced cell death in yeast and is rapidly upregulated during wounding and pathogen challenge. **The Plant Journal**, Oxford, v. 21, p. 393–399, 2000.

SANDMANN, G.; SCHEER, H. Chloroplast pigments: chlorophylls and carotenoids. In: RAGHAVENDRA, A.S. (Ed.). **Photosynthesis, a comprehensive treatise**. New York: Cambridge University Press, 1998.

SCHLAPPI, M.; HOHN, B. Competence of immature maize embryos for *Agrobacterium*-mediated gene transfer. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 4, p. 7-16, 1992.

SCHNEIDER, H. **Métodos de análise filogenética: um guia prático**. Ribeira Preto: Holos Editora; Sociedade Brasileira de Genética, 2003. 114 p.

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

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

SHOU, H.; BORDALLO, P.; WANG, K. Expression of the Nicotiana protein kinase (NPK1) enhanced drought tolerance in transgenic maize. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, p. 1013-1019, 2004.

SHRAWAT, A.K.; LÖRZ, H. *Agrobacterium*-mediated transformation of cereals: a promising approach crossing barriers. **Plant Biotechnology Journal**, Bristol, v. 4, p. 575-603, 2006.

SITIA, R.; BRAAKMAN, I. Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. **Nature**, Washington, v. 426, p. 891-894, 2003.

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

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

SOMERS, D.A.; MAKAREVITCH, I. Transgene integration in plants: poking or patching holes in promiscuous genomes? **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 15, p. 126–131, 2004.

STELLER, H. Mechanism and genes of cellular suicide. **Science**, Washington, v. 267, n. 5203, p. 1445-1449, 1995.

STACHEL, S.E.; MESSENS, E.; VAN MONTAGU, M.; ZAMBRYSKI, P. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature**, London, v. 318, p. 624-629, 1985.

SUGIHARTO, B. Biochemical and molecular studies on sucrose-phosphate synthase and drought inducible-protein in sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Journal ILMU DASAR**, v. 5, n. 1, p. 62-67, 2004.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TAKABATAKE, R.; ANDO, Y.; SEO, S.; KATOU, S.; TSUDA, S.; OHASHI, Y.; MITSUHARA, I. MAP Kinases function downstream of HSP90 and upstream of mitochondria in TMV resistance gene N-mediated hypersensitive cell death. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 48, n. 3, p. 498 – 510, 2007.

TAKATSUKI, A.; ARIMA, K.; TAMURA, G. Tunicamycin, a new antibiotic I. Isolation and characterization of tunicamycin. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 24, n. 4, p. 215-223, 1971.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007.

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

THOMASHOW, M.F. So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots! **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, p. 89–93, 2001.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, London, v. 22, n. 22, p. 4673-4680.

TIMMERMANS, M.C.; MALIGA, P.; VIEIRA, J.; MESSING, J. The pFF plasmids: cassettes utilising CaMV sequences for expression of foreign genes in plants. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 14, p. 333-344, 1990.

TRAVERS, K.J.; PATIL, C.K.; WODICKA, L.; LOCKART, D.J.; WEISSMAN, J.S.; WALTER, P. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein reponse and ER-associated degradation. **Cell**, Cambridge, v. 101, p. 249-258, 2000.

TSUJIMOTO, Y.; SHIMIZU, S. Bcl-2 family: life-or-death switch. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 466, p. 6–10, 2000.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. Disponível em: <<http://www.portalunica.com.br>>. Acesso em: 20 jan. 2009.

VAUX, D.L. Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiology cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, p. 786-789, 1993.

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

WANG, K.; HERRERA-ESTRELLA, L.; VAN MONTAGU, M.; ZAMBRYSKI, P. Right 25-bp terminus of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome. **Cell**, Cambridge, v. 38, p. 455-462, 1984.

WATANABE, N.; LAM, E. Recent advance in the study of caspase-like proteases and Bax-inhibitor 1 in plants: their possible roles as regulator of programmed cell death. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.5, p.65-70, 2004.

_____. *Arabidopsis* Bax inhibitor-1 functions as an attenuator of biotic and abiotic types of cell death. **The Plant Journal**, Oxford, v. 45, n. 6, p. 884-894, 2006.

_____. BAX Inhibitor-1 modulates endoplasmic reticulum stress-mediated programmed cell death in *Arabidopsis*. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 283, n. 6, p. 3200-3210, 2008.

WEI, H.; ALBERT, H.H.; MOORE, P.H. Differential expression of sugarcane polyubiquitin genes and isolation of promoters from two highly-expressed members of the gene family. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 155, p. 513–519, 1999.

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

WERTZ, I.E.; HANLEY, M.R. Diverse molecular provocation of programmed cell death. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 21, p. 359-364, 1996.

WILLIAMS, G.T.; SMITH, C.A.; MCCARTHY, N.J.; GRIMES, E.A. Apoptosis: final control point in cell biology. **Trends in Cell Biology**, Cambridge, v. 2, p. 263–267, 1992.

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

XU, P.; ROGERS, S.J.; ROOSSINCK, M.J. Expression of antiapoptotic genes bcl-xL and ced-9 in tomato enhances tolerance to viral-induced necrosis and abiotic stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, p. 15805–15810, 2004.

XU, Q.; REED, J.C. Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. **Molecular Cell**, New York, v. 1, p. 337-346, 1998.

YANJUN, M.; HENDERSHOT, L.M. ER chaperone functions during normal and stress conditions. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, Amsterdam, v. 28, p. 51-65, 2004.

YOSHINAGA, K.; ARIMURA, S.; HIRATA, A.; NIWA, Y.; YUN, D.J.; TSUTSUMI, N.; UCHIMIYA, H.; KAWAI-YAMADA, M. Mammalian Bax initiates plant cell death through organelle destruction. **Plant Cell Reports**, New York, v. 24, p. 408–417, 2005.

YU, L.H.; KAWAI-YAMADA, M.; NAITO, M.; WATANABE, K.; REED, J.C.; UCHIMIYA, H. Induction of mammalian cell death by a plant Bax inhibitor **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 512, p. 308–312, 2002.

ZAMBRYSKI, P.C. Chronicle from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transferer story. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 43, p. 465-490, 1992.

ZHA, A. FISH, H.A.; YAFFE, M.P.; MAHAJAN, N.; HERMAN, B.; REED, J.C. Structure-function comparisons of the proapoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 16, p. 6494-6508, 1996.

ZHANG, L.; XU, J.; BIRCH, R.G. Engineered detoxification confers resistance against a pathogenic bacterium. **Nature Biotechnology**, New York, v. 17, n. 10, p. 1021-1024, 1999.

ZHENG, Z.; MURAI, N. A distal promoter regions of the rice seed storage protein glutelin gene enhanced quantitative gene expression. **Plant Science**, Amsterdam, v. 128, p. 59-65, 1997.