

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

**Transformação Genética de Cana-de-açúcar com genes da aquaporina  
SspTIP1;1 e SspPIP1;4**

**Frederico Almeida de Jesus**

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

**Piracicaba  
2010**

**Frederico Almeida de Jesus**  
**Engenheiro Agrônomo**

**Transformação genética de cana-de-açúcar com genes da aquaporina SspTIP1;1 e SspPIP1;4**

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

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

**Piracicaba**  
**2010**

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

Jesus, Frederico Almeida de  
Transformação genética de cana-de-açúcar com genes da aquaporina SspTIP1;1 e  
SspPIP1;4 / Frederico Almeida de Jesus. - - Piracicaba, 2010.  
55 p.

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

1. Biolística 2. Cana-de-açúcar 3. Engenharia genética 4. Plantas transgênicas 4  
Proteínas de transporte I. Título

CDD 633.61  
J58t

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

A todos que mobilizaram seu trabalho, tempo e paciência para que este trabalho fosse concluído.  
E aos muitos que torceram pelo sucesso do mesmo.

Dedico,

Aos meus pais, que mesmo não compreendendo bem minha opção de carreira profissional, jamais deixaram de me apoiar e me confortar ao longo dessa jornada acadêmica.

Ofereço,



## SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Cana-de-açúcar.....	16
2.2 Transformação genética de cana-de-açúcar.....	17
2.3 Transformação genética via biobalística.....	18
2.4 Regeneração de plantas de cana-de-açúcar.....	19
2.5 Silenciamento gênico.....	20
2.6 Aquaporinas.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Material vegetal.....	22
3.2 Cultivo <i>in vitro</i> .....	22
3.3 Seleção de genes alvo para silenciamento via RNAi.....	24
3.4 Análise <i>in silico</i> .....	24
3.5 Vetores para transformação.....	25
3.6. Transformação genética.....	28
3.7 Isolamento de ácidos nucleicos.....	31
3.8 Confirmação do estado transgênico das plantas por PCR.....	32
3.9 Análise de expressão gênica via RT-PCR.....	33
4 RESULTADOS.....	36
4.1 Análise <i>in silico</i> .....	36
4.2 Transformação genética.....	39
4.3 Confirmação do estado transgênico das plantas por PCR.....	40
4.4 Análise de expressão gênica via RT-PCR.....	42
5 DISCUSSÃO.....	44
6 CONCLUSÕES.....	47
REFERÊNCIAS.....	49







## RESUMO

### **Transformação Genética de Cana-de-açúcar com genes da aquaporina *SspTIP1;1* e *SspPIP1;4***

A cana-de-açúcar vem assumindo um papel de destaque na atual conjuntura nacional, impulsionada principalmente pela produção de etanol, que vai de encontro com a crescente preocupação mundial na busca por fontes de energias renováveis e menos impactantes ao ambiente. Por essa razão, é preciso assegurar o contínuo desenvolvimento técnico-científico do setor sucroalcooleiro nacional, mantendo o Brasil na posição de vanguarda na produção de biocombustíveis. Ante a disponibilidade de inúmeras ferramentas biotecnológicas, tornou-se possível avançar com maior celeridade na compreensão dos campos da genética e fisiologia da cana-de-açúcar. Neste trabalho é demonstrado a transformação genética via biobalística da cultivar RB835486. No processo foram usadas duas construções para silenciamento gênico via RNA de interferência (RNAi), com genes quiméricos do tipo shRNA (short harpin RNA) para silenciamento dos genes *SspTIP1;1* e *SspPIP1;4*, em co-transformação com o gene marcador *npt-II*. Os dois genes alvo selecionados codificam aquaporinas, proteínas transmembrana responsáveis pelo transporte de água na planta. Estes genes foram identificados anteriormente por seu possível envolvimento no processo de acúmulo de sacarose. A co-integração dos cassetes de silenciamento gênico e do gene marcador ocorreu em 13 plantas, sendo obtidas três linhagens para o gene *SspTIP1;1* e 10 linhagens para o gene *SspPIP1;4*. Dentre elas, duas linhagens *SspTIP1;1* e cinco linhagens *SspPIP1;4* foram analisadas via RT-PCR, quanto a possíveis modificações nos níveis de expressão dos genes alvos. Nas duas linhagens transgênicas avaliadas para silenciamento do *SspTIP1;1*, não houve redução em sua expressão em relação ao controle não transformado, possivelmente devido a efeitos de posição. Nas outras cinco linhagens transgênicas avaliadas para silenciamento do *SspPIP1;4*, houve redução significativa em seus níveis de expressão em três linhagens em relação ao controle não transformado. Nestas plantas serão realizadas as análises fisiológicas a fim de validá-las funcionalmente quanto ao transporte de água e acúmulo de sacarose.

**Palavras-chave** – biolística; cana-de-açúcar; engenharia genética; plantas transgênicas; proteínas de transporte.



**ABSTRACT****Genetic Transformation of Sugarcane with *SspPIP1;1* and *SspPIP1;4* genes**

Sugarcane has taken a leading role in the current national economy, mainly boosted by ethanol production, which meet the growing global concern on searching for renewable energy and with low impact on the environment. Therefore, it is necessary to ensure the continuous technical and scientific development of the national sugar and ethanol sector, maintaining the leading position of Brazil in biofuel production. By the availability of numerous biotechnology tools, it became possible to advance more rapidly in understanding the fields of genetics and physiology of sugarcane. This work demonstrated the genetic transformation of the cultivar RB835486 via biolistic assay. In the process it was used two constructs for gene silencing via RNA interference (RNAi) with chimeric genes of the type shRNA (short harpin RNA) for silencing of the genes *SspTIP1;1* and *SspPIP1;4*, co-transformed with the marker gene *npt- II*. The two selected target genes encode aquaporins, transmembrane proteins which are responsible for water transport in plants. These genes were previously identified for their possible involvement in the process of sucrose accumulation. The co-integration of both, the cassette gene silencing and gene marker was observed in 13 plants, three strains were obtained for the gene *SspTIP1;1* and 10 strains for gene *SspPIP1;4*. Among them, two strains of *SspTIP1;1* and five strains of *SspPIP1;4* were analyzed by RT-PCR, searching for possible changes in the levels of target gene expression. In the two transgenic lines evaluated for silencing *SspTIP1;1*, no reduction in expression compared to control non-transformed was obtained, possibly due to effects of position insertion of the gene in the genome. The other five transgenic lines evaluated for silencing of *SspPIP1;4*, a significant reduction in their expression levels was obtained in three strains when compared to the control untransformed plants. These silenced plants will be physiologically analyzed to validate their function on water transport and sucrose accumulation.

**Keywords** – Biolistic; sugarcane; genetic engineering; transgenic plants; transport proteins.



## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a cana-de-açúcar é uma das principais espécies agrícolas cultivadas no Brasil com produção anual em torno de 612 milhões de toneladas, colhidas em aproximadamente 7,50 milhões de hectares (estimativa da safra 2009/10, CONAB, 2009). A cultura desempenha um importante papel como geradora de emprego, renda e divisas para o País, líder mundial na exportação dos dois principais derivados da cana-de-açúcar, o açúcar e o etanol.

O açúcar é uma commodity internacional que apresentou um total comercializado de 50,8 milhões de toneladas na safra 2007/2008 (USDA, 2007). Os dados referentes ao consumo de açúcar indicam que a demanda mundial é crescente, com perspectivas de aumento no consumo (21,60%) e no comércio internacional (16,50%) para os próximos 10 anos (CONTINI *et al.*, 2006). De acordo com estimativas da Conab (2009), o Brasil produzirá cerca de 35 milhões de toneladas de açúcar na safra 2009/2010.

Apesar da indiscutível relevância da produção de açúcar, o principal responsável pela recente projeção do setor sucroalcooleiro é o etanol, uma fonte de energia mais limpa e que figura como principal alternativa ao petróleo e seus derivados. Nas discussões atuais sobre o desenvolvimento sustentável do planeta, o etanol representa uma resposta positiva à crescente preocupação com a segurança no abastecimento energético para os meios de transporte e, paralelamente, a necessidade de redução nas emissões de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), o principal responsável pelo aquecimento global.

A produção de etanol vem crescendo gradativamente nas últimas décadas. No ano de 1990, o Brasil produziu cerca de 12,5 bilhões de litros de etanol e as estimativas para a safra atual giram em torno de 26 bilhões de litros, o que representa um aumento de mais de 100% em apenas vinte anos (CONAB, 2009). A previsível e aparentemente inevitável crise do petróleo, resultado do esgotamento das reservas mundiais, acarretará em uma elevação contínua da demanda mundial por etanol. Projeções recentes apontam para um aumento de 26,66% na comercialização internacional de etanol até 2016 (FAPRI, 2007). Ante a essa realidade, o desenvolvimento de novas tecnologias para o aperfeiçoamento da produção sucroalcooleira no País é condição estratégica para o posicionamento do Brasil como líder e principal fornecedor mundial de etanol em um futuro próximo.

Para manter esse nível de crescimento apresentado nos últimos anos, o aumento da produção não deverá ser fundamentado apenas na incorporação de novas áreas de cultivo da cana-de-açúcar, mas também no aumento da produtividade dos canaviais. Diversas são as frentes de trabalho visando o aumento da produtividade: do desenvolvimento de novas técnicas de manejo da cultura e práticas industriais, até o melhoramento genético vegetal, com o lançamento de cultivares superiores adaptadas a diferentes condições de cultivo.

As cultivares modernas de cana-de-açúcar são híbridos interespecíficos, originários de cruzamentos realizados no início do século XX, entre *Saccharum officinarum* L.,  $2n = 80$  cromossomos e, *Saccharum spontaneum* L.,  $2n = 40-128$  cromossomos. De acordo com Roach (1989, apud LAKSHMANAN *et al.*, 2005), poucos clones de *S. officinarum* e *S. spontaneum* foram utilizados no desenvolvimento destes primeiros híbridos. Os programas modernos de melhoramento genético de cana-de-açúcar, em sua maioria, contam com extensivos cruzamentos de cultivares-elite derivados desses híbridos iniciais (LAKSHMANAN *et al.*, 2005). A complexidade do genoma poliplóide das cultivares de cana-de-açúcar, somada a sua base genética relativamente restrita, impõe grandes dificuldades à aplicação das técnicas do melhoramento genético tradicional, além de constituir um grande desafio à sua análise.

Dada a complexidade da espécie, a Biologia Molecular pode ser considerada como uma ferramenta em potencial para o desenvolvimento de novas variedades. Desta forma, foi lançado o Brazilian Sugarcane EST Project – SUCEST (VETTORE *et al.*; 2001) com o objetivo de identificar genes associados a características agrônômicas de interesse, como tolerância a estresses bióticos e abióticos, conteúdo de açúcar, nutrição mineral, entre outros. Um total de 237.954 ESTs de alta qualidade foram obtidas utilizando quatro cultivares de cana-de-açúcar, oriundas de 27 bibliotecas de cDNA, representando diversos órgãos, estágios de desenvolvimento, estresse induzido por temperatura e interação com bactérias fixadoras de nitrogênio (VETTORE *et al.*, 2001).

Dentre os trabalhos realizados a partir da construção do banco de dados SUCEST, destacam-se os resultados obtidos por Papini-Terzi *et al.* (2009) na identificação de genes responsáveis pela regulação do conteúdo de sacarose em cana-de-açúcar. Os autores relataram que genes da família das aquaporinas apresentaram expressão inversamente proporcional ao teor de brix (sólidos solúveis totais). Entre as aquaporinas identificadas nesses ensaios, duas foram altamente associadas ao teor de açúcar (PAPINI-TERZI *et al.*, 2007).

A engenharia genética, através da transformação genética de plantas, pode ser empregada na caracterização funcional de genes candidatos envolvidos em processos fisiológicos específicos, utilizando a técnica de genética reversa.

O objetivo do presente trabalho é a transformação genética da cana-de-açúcar visando a validação funcional de dois genes que codificam aquaporinas, a fim de estudar as funções exercidas por esses genes durante a maturação e acúmulo de sacarose nos colmos de cana-de-açúcar.

Para tal foi utilizada a técnica de silenciamento via RNA de interferência (RNAi), a partir da construção de genes quiméricos chamados de short harpin RNAs (shRNAs) (WATSON et al., 2008). Os shRNAs foram apropriadamente desenhados para silenciar os genes *SspTIP1;1* e *SspPIP1;4*, que codificam uma aquaporina da subfamília TIP e uma da subfamília PIP, respectivamente. A inserção dos shRNAs no genoma nuclear de cana foi feita por transformação genética via biobalística.





## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta alógama, da família Poaceae, tribo Andropogonae, gênero *Saccharum*. Neste gênero há seis espécies descritas: *S. officinarum* L. (2n=80), *S. robustum* Brandes e Jeswiet ex Grassl (2n=60-205), *S. barberi* Jeswiet (2n=111-120), *S. sinense* Roxb. (2n=81-124), *S. spontaneum* L. (2n=40-128) e *S. edule* Hassk (2n=60-80) (DANIELS; ROACH, 1987). O centro de diversidade e de dispersão destas espécies é a região entre a Indonésia e Nova Guiné (MATSUOKA; GARCIA; ARIZONO; 2005).

A primeira introdução da cana-de-açúcar no Brasil ocorreu na Capitania de São Vicente, em 1532, embora seja possível que tenha sido trazida para outras regiões da costa brasileira em expedições anteriores (JUNQUEIRA; DANTAS, 1964).

O crescimento da atividade canavieira no Brasil é principalmente devido ao melhoramento tradicional, não só pelo desenvolvimento de cultivares, em torno de cinco a seis por volta de 1970 e, atualmente, cerca de 500; como também pelo incremento da produtividade, que nesse mesmo período teve um aumento próximo de 40 toneladas por hectare (NÓBREGA; DORNELAS, 2006).

As cultivares de cana-de-açúcar atualmente plantadas são híbridos, em que predomina a contribuição da espécie *S. officinarum*, com alguma participação de *S. spontaneum*, e menor contribuição de *S. sinensi* e *S. barberi*. Em alguns casos também foram utilizadas plantas de *S. robustum* na produção de híbridos (MATSUOKA; GARCIA; ARIZONO; 2005). Estudando a estrutura do genoma da cana-de-açúcar, D'Hont (2005) verificou que a cultivar R570 apresenta 80% dos cromossomos oriundos de *S. officinarum*, 10% dos cromossomos de *S. spontaneum* e 10% de cromossomos recombinantes.

Ainda hoje, o melhoramento tradicional é o principal meio para obtenção de clones de cana. 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 cultivar. O sucesso de um programa de melhoramento depende, entre outros fatores, do estudo preliminar no local de cruzamento para que se conheça a época de florescimento, do comportamento da abertura das anteras e da

viabilidade do pólen de cada variedade participante do cruzamento. Outros fatores como problemas citogenéticos e os mecanismos de incompatibilidade genética ou citoplasmática, também influenciam no sucesso dos cruzamentos (CESNIK; MIOCQUE, 2004).

Freqüentemente, os cruzamentos entre cultivares-elite ocasionam eventos de recombinação complexos, gerando híbridos aneuplóides que possuem diferentes proporções de cromossomos e variações em seus conjuntos cromossômicos (GRIVET; ARRUDA, 2002). Por esse motivo, a homozigose em cana-de-açúcar é um desafio distante de ser alcançado e, de forma geral, os melhoristas desta cultura têm se dedicado ao estudo de caracteres quantitativos de grande importância (HOGARTH, 1987).

## **2.2 Transformação genética de cana-de-açúcar**

Os desafios inerentes ao melhoramento tradicional de cana-de-açúcar podem ser abordados de forma mais efetiva com uso da engenharia genética.

A transformação genética de cana-de-açúcar pode ser empregada como uma ferramenta útil ao melhoramento tradicional, facilitando a introdução de genes de importância agrônômica em cultivares-elite de cana-de-açúcar. A caracterização funcional de genes candidatos a estarem envolvidos em processos fisiológicos específicos, utilizando a técnica de genética reversa, abre novas possibilidades no desenvolvimento de variedades mais adaptadas a diferentes condições ambientais. Em adição, a cana-de-açúcar apresenta características que a tornam uma excelente planta para o melhoramento através da transformação genética, dentre as quais a facilidade para regeneração de calos *in vitro* (HEINZ *et al.*, 1977; IRVINE, 1984; CHEN *et al.*, 1988) o modo de multiplicação em escala comercial e a propagação vegetativa, que possibilita a distribuição de transformantes estáveis aos produtores através de mudas (GALLO-MEAGHER; IRVINE, 1996).

O primeiro relato bem sucedido de transformação e regeneração de plantas transgênicas é o de Bower e Birch (1992), que inseriram o gene *npt-II* (*neo*) na cultivar de cana-de-açúcar Pindar, que confere resistência a antibióticos aminoglicosídeos. Atualmente, existem plantas transgênicas de cana-de-açúcar resistentes a herbicidas (CHOWDHURY; VASIL, 1992; FALCO, 1998), a insetos (PASSARIN, 2009), ao vírus causador do mosaico amarelo (GILBERT, 2009), à bactéria causadora da escaldadura das folhas (ZHANG *et al.*, 1999) , tolerantes ao déficit hídrico (ZHANG *et al.*, 2006), com maior acúmulo de sacarose (WANG, 2008) e produção de plástico

biodegradável (pHBA) (McQUALTER et al., 2005), além da cana-de-açúcar transgênica também ter sido usada como plataforma para produção de um fator de estímulo humano (GMCSF) empregado no tratamento da neutrofenia e anemia aplástica (WANG et al., 2005).

### 2.3 Transformação genética via biobalística

Os principais métodos de transferência direta para a transformação genética são físicos ou químicos. Algumas diferenças nos métodos de transformação genética têm sido descritas, incluindo o bombardeamento de partículas em calos embriogênicos (BOWER; BIRCH, 1992; GALLO-MEAGHER; IRVINE, 1996) também conhecido como biolística (PASSARIN, 2009; BARBOSA, 2010).

Dentre esses métodos, a biolística tem sido freqüentemente utilizada para geração de cultivares transgênicas comerciais e para transferir os transgenes ao interior dos tecidos embriogênicos alvo e continua a ser a principal técnica de transferência em biotecnologia de plantas. Uma das maiores vantagens da biolística é a não dependência das limitações biológicas inerentes a infecção por agrobactéria. Para uma transformação estável e a recuperação de plantas transgênicas, a biolística está restrita apenas à necessidade de transferir o DNA para o interior de células totipotentes. Esta restrição elimina quase todos os incidentes biológicos que limitam a transformação de outros métodos. A biolística tem facilitado a transformação de algumas das espécies vegetais mais recalcitrantes (ALTPETER et al., 2005).

Neste o método de transformação genética em que são utilizados plasmídeos clonados com o gene de interesse e marcadores selecionáveis. Os plasmídeos possuem uma origem de replicação de *Escherichia coli* e um gene marcador de resistência a antibiótico para seleção de bactérias que levam o inserto. O uso desta técnica de transformação possibilita utilizar vários tecidos alvo, como folhas, calos, caules, raiz, células em suspensão e outros explantes, os quais têm sido empregados em inúmeros trabalhos. A escolha do tecido alvo é um dos fatores fundamentais no processo de transformação genética por biolística (GAMBLEY et al., 1993; BARBOSA, 2010).

Um gene marcador de resistência a antibiótico para selecionar as plantas transformadas durante o cultivo *in vitro* também é utilizado. Este marcador seletivo pode ou não estar presente no mesmo cassete de construção do gene de interesse. Quando separados, estas construções

podem ser utilizadas em conjunto (co-transformação) para recobrir as micropartículas a serem utilizadas no bombardeamento do tecido alvo. O bombardeio de partículas é um o método de escolha para co-transformação genética com múltiplos genes, já que apresenta alta eficiência para espécies monocotiledôneas e possibilita a introdução simultânea de vários genes concomitantemente (BOWER; BIRCH, 1992; LIMA 2001).

Diversos promotores têm sido identificados, mas de forma geral, em cana-de-açúcar e demais monocotiledôneas, o promotor mais utilizado ainda é o da ubiquitina (Ubi-1) do milho (CHRISTENSEN; QUAIL 1996).

#### **2.4 Regeneração de plantas de cana-de-açúcar**

A cultura de tecido para regeneração de plantas de cana-de-açúcar pode ocorrer por duas rotas morfogênicas: a organogênese e a embriogênese. Na organogênese ocorre a formação unipolar, denominada primórdio vegetativo de órgãos com sistema vascular conectado ao tecido de origem. Na embriogênese somática ou adventícia, as células se diferenciam e formam embriões somáticos com estruturas bipolares – embriões somáticos com uma raiz e um broto meristemático não conectado ao explante pelo sistema vascular. As células somáticas vegetais, quando isoladas e cultivadas *in vitro* têm a capacidade de expressar totipotencialidade (TAYLOR; DIKIC, 1993; LAKSHMANAN et al., 2005).

A produção de calos embriogênicos a partir de folhas imaturas de várias cultivares de cana-de-açúcar foi realizada para regenerar plantas a partir desses calos (CHEN et al., 1988; FALCO, 1996; LAKSHMANAN, 2006; BARBOSA, 2010). O material vegetal mais utilizado para transformação genética de cana-de-açúcar por biolística são os calos embriogênicos provenientes de folhas jovens. Em cana-de-açúcar a regeneração de plantas via embriogênese somática indireta, por meio de calos embriogênicos, foi obtida a partir de finas lâminas foliares cultivadas (SNYMAN, 2000; LAKSHMANAN et al. 2006; FRANKLIN, 2006; BARBOSA, 2010).

A produção de calos embriogênicos pode ser obtida pelo uso do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (GALLO-MEAGHER; ENGLISH; ABOUZID, 2000; BARBOSA, 2010) e pela administração de água-de-coco (FALCO, 1996; LAKSHMANAN et al., 2006). Na cana-de-açúcar o 2,4-D pode ser utilizado em conjunto com outro regulador de crescimento, a cinetina,

que pertence à família das citocininas que promovem as divisões celulares no tecido vegetal, o qual cresce como um calo indiferenciado com características embriogênicas e não embriogênicas.

Os discos foliares (segmentos de folhas sobrepostas) de cana-de-açúcar são capazes de formar plantas inteiras pela via organogênica e embriogênica e tem sido o tecido alvo alternativo ao processo de transformação genética de cana-de-açúcar (DESAI, 2004; LAKSHMANAN, 2005; 2006; SNYMAN et al., 2006; BARBOSA, 2010).

## 2.5 Silenciamento gênico

Atualmente, está claro que muito genes, nos mais diversos organismos são regulados por silenciamento transcricional ou pós-transcricional mediado por pequenos RNAs produzidos a partir de longas moléculas de RNA dupla fita (double strand RNA – dsRNA), após serem processados pelas enzimas da família Dicer (MARGIS *et al.*, 2006). Este mecanismo é conhecido como RNA de interferência (RNAi).

Os pequenos RNAs que dirigem o RNAi possuem vários nomes, em função de sua biogênese. Aqueles feitos artificialmente ou produzidos *in vivo* de precursores dsRNAs são tipicamente chamados de pequenos RNAs de interferência (small interfering RNAs – siRNAs). Outro grupo de RNA regulatórios são os microRNAs (miRNAs). Eles são derivados de RNAs precursores que são codificados por genes expressos em células onde esses miRNAs têm função regulatória específica (WATSON *et al.*, 2008)

Esses RNAs regulatórios conferem especificidade a efetores que podem atuar de três formas distintas para alterar a expressão gênica: clivando o RNA mensageiro (mRNA) do gene alvo; impedindo a sua tradução ou inibindo sua transcrição por causar modificações na configuração da cromatina dentro do gene alvo (SMALL, 2007).

Os efetores que constituem a maquinaria de silenciamento são chamados de complexo de silenciamento induzido por RNA (RNA-induced silencing complex – RISC) (HAMMOND *et al.*, 2000). O RISC, contém além do siRNA ou do miRNA, várias proteínas, incluindo um membro da família Argonauta. As Argonautas possuem um domínio PIWI (P ELEMENT-INDUCED WIMPY TESTIS), que exibe atividade RNaseH que cliva o mRNA alvo na região complementar ao pequeno RNA (siRNA ou miRNA) (TOLIA; JOSHUA-THOR, 2007; HUTVAGNER; SIMARD, 2008).

O mecanismo de silenciamento gênico via RNAi vem sendo utilizado em diversos organismos como uma poderosa ferramenta experimental, provendo meios de “desligar” a expressão de genes específicos, permitindo a validação funcional dos mesmos.

## 2.6 Aquaporinas

Aquaporinas são pequenas proteínas integrais de membrana, que pertencem à antiga família major intrinsic protein (MIPs), com membros em animais, microorganismos e plantas. (KALDENHOFF *et al.*, 2008).

O primeiro membro descrito desta família foi CHIP28, expressas em eritrócitos humanos (PRESENTON *et al.*, 1992). Um ano após a descoberta da existência das aquaporinas, foi descrito o primeiro membro em plantas,  $\gamma$ -TIP isolada da membrana vacuolar de arábido (*MAUREL et al.*, 1993).

Em plantas, as aquaporinas apresentam um grande número de genes, agrupados em quatro diferentes subfamílias baseado em similaridade de suas seqüências: plasma membrane intrinsic proteins (PIPs), tonoplast intrinsic proteins (TIPs), NOD26-like intrinsic proteins (NIPs) e small basic intrinsic proteins (SIPs) (JOHANSON *et al.*, 2001).

As aquaporinas são canais protéicos presentes na membrana plasmática e em membranas intracelulares, responsáveis pelo transporte de água e pequenos solutos neutros, como uréia, ácido bórico, ácido salicílico e gases como amônia e dióxido de carbono (*MAUREL et al.*, 2008).

A estrutura protéica das aquaporinas apresenta características conservadas. É constituída de seis hélices conectadas por três alças extracelulares e duas alças intracelulares, com as porções N- e C-terminal projetadas para o citoplasma (KALDENHOFF *et al.*, 2008). Dois motivos de aminoácidos altamente conservados, asparagina-prolina-alanina (NPA) estão localizados na primeira alça intracelular e na terceira alça extracelular (TÖRNROTH-HORSEFIELD *et al.*, 2006). Esses motivos são responsáveis pela orientação dipolar no transporte de água, o que resulta num isolamento transiente da molécula de água da fila de moléculas de água que preenchem o poro (*MAUREL et al.*, 2008). Outro motivo conservado é chamado de Ar/R, que é formado no lado externo da membrana pelo arranjo espacial de aminoácidos aromáticos (Ar), como fenilalanina e histidina, faceando um resíduo de arginina (R). O transporte de prótons é bloqueado pela repulsão eletrostática em Ar/R (*MAUREL et al.*, 2008).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

As atividades 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

A cultivar RB835486 foi escolhida para a realização dos experimentos neste estudo. O material vegetal foi gentilmente cedido pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), oriundo da Unidade Experimental de Araras, do Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-açúcar da Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro (RIDESA).

A cultivar RB835486 destaca-se por apresentar alta produtividade agrícola e ampla adaptabilidade, sendo recomendada para plantio em solos ácidos de cerrado. Seu período de colheita estende-se de junho a setembro; possui alto teor de sacarose e período de utilização industrial (PUI) longo (RIDESA, 2008).

#### 3.2 Cultivo *in vitro*

A maioria dos processos de transformação genética de plantas apresenta alguma etapa de cultivo *in vitro*. Um protocolo eficiente de regeneração de plantas *in vitro* da espécie de interesse precede qualquer trabalho de transformação genética que venha a ser realizado.

Os procedimentos utilizados no Laboratório de Biologia Molecular Genômica para cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar são descritos a seguir.

##### 3.2.1 Regeneração de plantas de cana-de-açúcar a partir de calos embriogênicos

Os explantes empregados para formação de calos foram obtidos de palmitos de plantas com idade em torno de oito a 10 meses. O palmito é a região que contém o meristema apical caulinar, protegido por folhas jovens enroladas.

No canavial, a porção superior com os últimos entrenós (“ponteiro”) foi cortada de um dos colmos da touceira da planta e os limbos foliares expandidos foram desbastados. No laboratório, as bainhas foliares restantes foram destacadas uma a uma até se chegar às folhas jovens enroladas, que constituem o palmito. Após a retirada das bainhas mais externas os palmitos apresentavam cerca de 15.0 cm de comprimento e 2.0 cm de diâmetro. Antes da desinfestação, as extremidades foram eliminadas deixando os palmitos com aproximadamente 10.0 cm de comprimento.

A desinfestação foi realizada por imersão dos palmitos em etanol comercial (95.26°GL) durante um minuto, seguida de imersão em solução de hipoclorito de sódio (1.5%) durante 15 minutos, sob leve agitação. Os palmitos desinfestados foram levados ao fluxo laminar onde foram retiradas mais uma ou duas folhas, sendo as folhas restantes seccionadas transversalmente na espessura de 2.0 mm (LAKSHMANAN *et al.*, 2006).

As secções transversais, ou discos foliares, foram colocadas em placas de Petri (90x15 mm) com a face distal do explante em contato com meio de cultura (LAKSHMANAN *et al.*, 2006). O meio de cultura empregado foi o MS<sub>3</sub>C semi-sólido, baseado na concentração de sais e vitaminas do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g/L de sacarose, 0.1 mg/L de citocinina, 3 mg/L de ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D), com pH ajustado para 5.8 e solidificação com 2 g/L de Phytigel<sup>®</sup> (Sigma Aldrich<sup>®</sup>). O cultivo foi realizado em câmara de crescimento, na ausência de luz e sob temperatura constante de 27°C ± 2°C.

Em intervalos sucessivos de 21 dias, os explantes foram repicados e transferidos para meio fresco. Em cada etapa do subcultivo, foi realizada a seleção das colônias de células embriogênicas, que começaram a surgir das bordas e da porção superior dos discos foliares. Após três etapas de subcultivo, as colônias estavam maiores e livres de tecidos do explante inoculado. Nesse estágio as colônias passaram a ser consideradas calos embriogênicos.

Para regeneração de plantas de cana-de-açúcar, os calos embriogênicos foram transferidos para frascos de vidro contendo meio MS e expostos a luz, sob fotoperíodo de 16 horas. O início da formação de brotos foi verificado em aproximadamente 21 dias. Após 40 a 50 dias de exposição à luz, iniciou-se a formação de raiz, completando o estabelecimento da planta *in vitro*.

### 3.2.2 Regeneração de plantas de cana-de-açúcar a partir de discos foliares



O procedimento de preparo e obtenção do explante a ser inoculado é o mesmo descrito no item 1.1.1.

Os discos foliares foram inoculados em placas de Petri (90x15 mm), contendo meio MS<sub>3</sub>C, e cultivados em câmara de crescimento, na ausência de luz e sob temperatura constante de 27°C ± 2°C, durante 15 dias. Em seguida, os discos foliares foram transferidos para frascos de vidro contendo meio MS, os quais foram expostos à 16 horas de luz por dia para indução da regeneração de plantas. Após 15 dias iniciou-se a formação de brotos e em torno de 30 a 45 dias a planta desenvolveu raízes, estando completamente estabelecida.

### **3.3 Seleção de genes alvo para silenciamento via RNAi**

Foram selecionados dois genes de cana-de-açúcar identificados no projeto SUCEST, anotados sob os seguintes números SAS (Sugarcane Assembled Sequence): SCCCRZ1001F02.g e SCCCRZ1002E08.g, nomeados AQUA1 e AQUA3. Estes genes foram identificados como membros da família das aquaporinas e suas expressões foram relacionadas ao conteúdo de sacarose nos colmos de cana-de-açúcar (PAPINI-TERZI *et al*, 2007; 2009).

### **3.4 Análise *in silico***

Para as análises *in silico*, as seqüências de nucleotídeos dos genes de cana-de-açúcar selecionados foram comparadas com as seqüências disponíveis no banco de dados público NCBI (National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A busca foi feita através da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (ALTSCHUL *et al.*, 1990), utilizando a variação BLASTx deste software. Para a tradução e identificação de domínios conservados nas seqüências de nucleotídeos foram utilizados os *softwares* Expasy (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>) e CD Search (*Conserved Domain Search Service* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). O programa ClustalW (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) foi utilizado para o alinhamento dos domínios conservados, sendo os parâmetros definidos como padrões (*default*). As árvores genealógicas foram construídas com o auxílio do programa MEGA 4.0 (TAMURA *et al.*, 2007), com modelo de comparação Neighbor-joining (SAITOU; NEI, 1987), método de distância p e supressão pair-wise. A robustez dos

ramos gerados pela árvore foi medida pelo teste probabilístico bootstrap (SITNIKOVA; RZHETSKY; NEI, 1995), originado a partir de 1000 repetições.

### 3.5 Vetores para transformação genética

#### 3.5.1 Descrição dos vetores de silenciamento gênico

Os vetores AQUA 01\_SI e AQUA 03\_SI foram fornecidos pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gláucia Mendes Souza, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, campus de São Paulo.

Estes vetores foram construídos com o vetor de clonagem pKANNIBAL (WESLEY *et al.*, 2001; gene bank: AJ311873), comercializado pela Invitrogen™ para ser utilizado no silenciamento gênico via RNA de interferência – RNAi – em plantas (Figura 1).

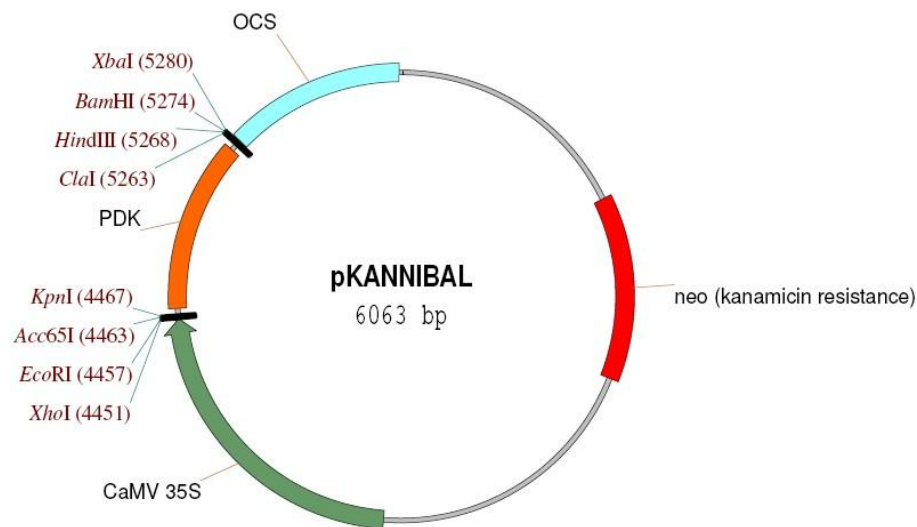


Figura 1 - Vetor de clonagem pKANNIBAL

O vetor pKANNIBAL é constituído por um promotor para expressão constitutiva, oriundo do gene da subunidade ribossomal 35S do vírus *Cauliflower mosaic virus (CMV)*, um íntron com a função de auxiliar na formação do harpin, oriundo do gene *PDK* de *Flaveria trinervia* que produz a piruvato ortofosfato diquinase, e por um terminador OCS de *Agrobacterium tumefaciens*, gene que codifica octopina sintase.

Nas regiões entre promotor e íntron, bem como entre íntron e terminador, existem dois sítios de clonagem distintos o que possibilita a inserção do mesmo fragmento do gene a ser

silenciado em orientação senso e antisenso, com o íntron intercalando estas seqüências reverso complementares. A presença de um íntron de um gene funcional entre os braços complementares do RNA dupla fita (dsRNA) demonstrou aumentar a eficiência no silenciamento do gene alvo em plantas de arabis quando comparado a uma seqüência de DNA intercalante qualquer (SMITH *et al.*, 2001)

O marcador seletivo presente no vetor é o gene *npt-II* (*neo*), isolado do transposon Tn5 de *Escherichia coli*, que codifica a aminoglicosídeo 3' fosfotransferase II, conferindo resistência a antibióticos aminoglicosídeos como canamicina, geneticina e paromomicina (ARAGÃO; RECH, 1998).

O vetor AQUA 01\_SI (Figura 2) possui dois fragmentos de 108 pb do gene SCCCRZ1001F02.g (número SAS), clonados em orientação senso e antisenso no vetor pKANNIBAL. A inserção senso foi clonada no primeiro sítio múltiplo de clonagem, entre o promotor 35S e o íntron PDK, nos sítios *XhoI* e *EcoRI*. A inserção antisenso foi clonada no segundo sítio múltiplo de clonagem, entre o íntron PDK e o terminador OCS, nos sítios *BamHI* e *XbaI*.

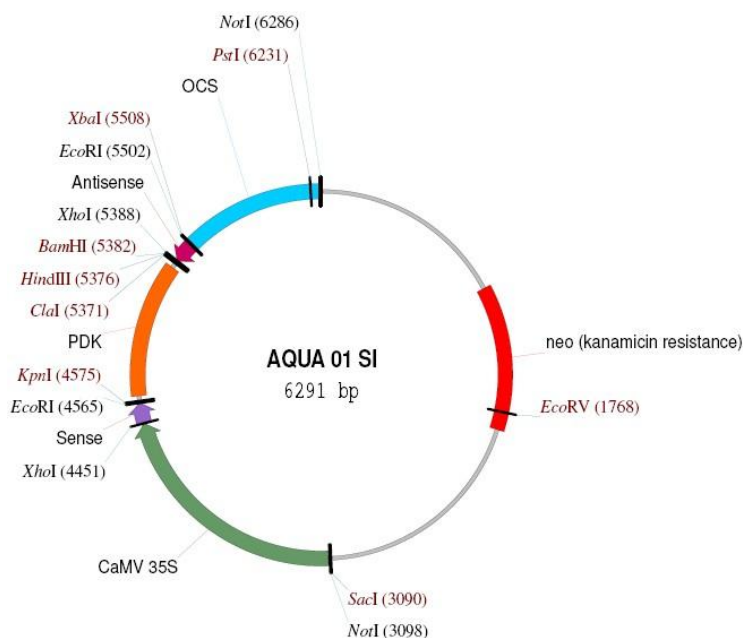


Figura 2. Vetor AQUA 01\_SI

A seqüência completa do gene AQUA1 é apresentada abaixo. A região realçada representa o fragmento utilizado para clonagem.

### AQUA1 (SCCCRZ1001F02.g)

GGAATCCCGGGTGCACCTACGCGTCCGCTCACACCCTGAGCTTAGCTTAGCTCCACTTAAGCTCCAGTCCAAGCAAGCAGTCGT  
 GGTTAGAGCTAGAGGGCCGTGAAAATGCCGATCAGCAGGATCGCCGTGGGGACCCACCATGAGGTGTACCACCCGGGCGCCCTCA  
 AGGGGGCGATCGCTGAGTTCATCTGCACCCTCATCTTCGTCTTCGCCGGCCAGGGCTCCGGCATGGCCTTCAGCAAGCTGACCAGC  
 GCGGGCGCGACGACCCCTCGGGGCTGATCGCGCGGGCTCTGGCGCACGCCTTCGCGCTGTTCTGTGGCGGTGTCCGTGGGCGCCA  
 ACATCTCCGGCGGGCACGTGAACCTGCCGTGACCTTCGGCGCGTTCGTGGGCGGCAACATCACCTGTTCCGGCGGCTCCTGTAC  
 TGGGTGGCGCAGCTGCTGGGCTCCACGGTGGCGTCTTCCTGCTCCGCTTCTCCACGGGCGGGCTGGCCACGGGCACCTTCGGCCT  
 CACGGGCGTCTCCGTGTGGGAGGCGTGGTGTGGAGATCGTGATGACCTTCGGGCTGGTGTACACGGTGTACGCCACCGCCGTG  
 GACCCCAAGAAGGGCAGCCTGGGCACCATCGCCCCATCGCCATCGGCTTCATCGTGGGCGCCAACATCCTGGTCCGCGCGCCT  
 TCACCGGCGCGTCCATGAACCCCGCCGTGCTTCGGCCCCGCGCTCGTCAGCTGGGAGTGGGGATACCAGTGGGTGTAAGTGGGTC  
 GGCCCCCTCATCGGCGCCGGCATCGCTGGCGTTATCTACGAGCTGCTTTCATCTCCACACCCACGAGCAGTCCCCACCACCGA  
 CTACTAAGCCGGCCGGCCGGCGGGCCAAACAAGTTTGGGTTCCGTCCTCCGTCTCCGTGCGCAGCTAGCAGATCATCACAGTTC  
 TCTGATCTCCCCCTCGCCGTTAGTTTCTCTCTCGTGCACGTGCATGCATCGTGCACCATCTCAAGTGTCTGCTGCTGCGCCGGCG  
 CCGCTCGCATGTTTGTCTTCTTGACCGATCAGTCTGAACCGTGAATTCGGACCCGTTTGTCTGTAAAATTTGTGCATTTGCC  
 TGAGTATTCACCGAGTCCACGTAGTAGTCTCTATAAT

O vetor AQUA 03\_SI (Figura 3) possui dois fragmentos de 180 pb do gene SCCCRZ1002E08.g (número SAS), clonados em orientação senso e antisenso no vetor pKANNIBAL. O inserto senso foi clonado no primeiro sítio múltiplo de clonagem, entre o promotor 35S e o íntron PDK, nos sítios *XhoI* e *EcoRI*. O inserto antisenso foi clonado no segundo sítio múltiplo de clonagem, entre o íntron PDK e o terminador OCS, nos sítios *BamHI* e *XbaI*.

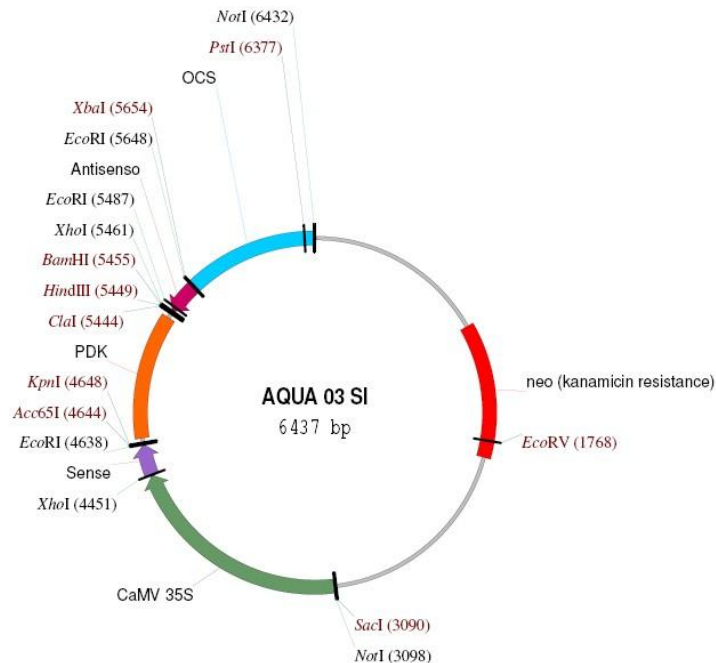


Figura 3 - Vetor AQUA 03\_SI

A seqüência completa do gene AQUA3 é apresentada abaixo. A região realçada representa o fragmento utilizado para clonagem.

### *AQUA3 (SCCCRZ1002E08.g)*

```
CACGCGTCCGACACCATTGATGCTGCTGCTCACTATAAGACTCTTCACTCCCGCTGCGACACAAGCACCACACCACCTCAGCTCAG
TTCAGCAACTAGCTTCTTCTTAGCTCTAGCTAGCCAGGCTCGGCTGCTGCAAGGAGCGAGCTAATAGCCGGCGACATGGAAGGG
AAGGAGGAGGACGTGCGCCTGGGCGCCAACAAGTTCTCGGAGCGCCAGCCATCGGCACGGCGGCGCAGGGCACCGACGACAAG
GACTACAAGGAGCCCCCGCGGCGCGCTCTTCGAGCCCGGGGAGCTCAAGTCGTGGTCTTCTACCGCGCGGGCATCGCCGAGT
TCGTGCCACCTTCTTCTTCTACATCTCCATCCTCACGTCATGGGCGTCTCCAAGTCCACCTCCAAGTGCGCCACCGTCGGCA
TCCAGGGCATCGCCTGGTCTTTGGCGGCATGATCTTCGCCCTCGTCTACTGCACCGCCGGCATCTCCGGCGGGCACATCAACCCG
GCGGTGACCTTCGGGCTGTTCTGGCTAGGAAGTTGTCGCTCACCAGGGCTGTTCTTACATCATCATGCAGTGCCTGGGCGCCAT
CTGCGGCGCCGCGTCGTC AAGGGGTTCCAGCAGGGGCTGTACATGGGCAACGGCGGGCGCCAACGTCGTGCGCCCCGGATAC
ACCAAGGGGCGACGGCTCGGCGCTGAGATCGTCGGCACCTTCATCCTCGTCTACACCGTCTTCTCCGCCACCGACGCCAAGAGGAA
CGCCAGGGACTCCCATGTGCCGATCCTTGCCCCGCTCCCAATCGGATTCGCGGTGTTCTGGTCCACCTGGCCACCATCCCCATCAC
CGGCACCGGCATCAACCCAGCGCGGAGCCTTGGCGCCGCGTCAATTAACAACCAGCACCATGCCTGGTCTGATCACTGGATCTTCT
GGTTCGGCCCTTCATCGGCGCTGCCCTGGCTGCCATCTACCACCAGGTGATCATCAGGGCCATCCCATTC AAGAGCAGGTCTTAA
GCTGGTGTGCTTTTCAGATGCCGATTCAAGAGGCAACCTGCGTTCTGATGGAGTTATTCTTATTTCATGGTTGTTTCCAATGCCTACA
ATGTTACGTGGAGTTCCCTCCGTTCTTCTTCAAGTTCGCTCTGCTTTTATCTGAACCCCGACTTGTAATTCAGTACCCAATTGTGTA
ATATGCAGCCGCTGTAATGTGAAAAAATCTTTTATGTTATG
```

#### 3.5.2 Descrição do vetor de co-transformação

A tecnologia da co-transformação permite a introdução de múltiplos genes de interesse em um único passo, facilitando o processo de transformação via biolística (FRANCOIS; BROEKAERT; CAMMUE, 2002).

Neste método, em adição ao(s) gene(s) de interesse, são inseridos genes marcadores para a identificação do material vegetal no qual houve integração do gene de interesse. Os genes marcadores são arranjados em cassetes dentro dos vetores para serem expressos constitutivamente nas células transformadas, permitindo o desenvolvimento destas na presença do agente seletivo adequado ao gene marcador.

Para esse fim, foi utilizado o vetor pHA9 em co-transformação com os vetores AQUA 01\_SI e AQUA 03\_SI. O vetor pHA9 possui um promotor para expressão constitutiva, o *UBI-1* de milho (*Zea mays* L.) do gene que codifica a poliubiquitina-1, um gene marcador, o *npt-II*, de *E. coli*, e um terminador NOS, do gene que codifica a nopalina sintase de *A. tumefaciens*.

### **3.6 Transformação genética**

#### 3.6.1 Biolística

O método de transformação genética por biobalística foi desenvolvido por Sanford *et al.* (1987 apud RECH; ARAGÃO, 1998) com o objetivo de introduzir material genético no genoma nuclear de plantas superiores.

Neste trabalho, foi utilizado o acelerador de partículas modelo PDS-1000/He Biolistic® Particle Delivery System (Bio-Rad), com pressão de disparo ajustada em 1100 psi.

Para esterilização das partículas e precipitação do DNA dos vetores de transformação, foi utilizado o protocolo descrito por Rech e Aragão (1998), com modificações. O DNA foi precipitado em partículas de tungstênio M10 de 0.8 µm (GTE Sylvania Chemicals/Metals), a uma concentração de 4.0 µg de DNA por mg de tungstênio. Para cada disparo, 5.0 µL da suspensão de micropartículas com o DNA foram pipetados no centro da membrana carreadora. A distância entre o material vegetal alvo e as partículas foi de 13.0 cm.

### 3.6.2 Transformação de calos embriogênicos de cana-de-açúcar

Calos a partir do terceiro subcultivo foram transferidos para meio osmótico MS<sub>3</sub>C, sobre papel filtro (6x6cm) autoclavado, distribuídos formando um círculo com cerca de 3.0 cm de diâmetro. O meio osmótico é utilizado para causar plasmólise parcial das células-alvo. Para aumentar a eficiência do processo de transformação genética dos calos embriogênicos, foram adicionados ao meio osmótico 73 g/L de manitol, 73 g/L de sorbitol e 150 mg/L de ácido cítrico. (VAIN *et al.*, 1993). Os calos permaneceram por quatro horas nas placas de Petri (90x15mm) contendo meio osmótico antes de serem bombardeados. Para o bombardeamento, foram utilizadas micropartículas de tungstênio cobertas com 10.0 µg de DNA dos vetores de transformação, sendo 5.0 µg do vetor pHA9 e 5.0 µg de um dos vetores AQUA 01\_SI ou AQUA 03\_SI.

Em seguida, os calos embriogênicos foram transferidos para meio MS<sub>3</sub>C acrescido de 250 mg/L de ceftazidima, antibiótico utilizado para impedir a eventual proliferação de bactérias endofíticas. Os calos permaneceram nesse meio por dois dias, em câmara de crescimento, na ausência de luz e na temperatura de 27°C ± 2°C. Esse período é necessário para que os calos bombardeados recuperem-se do estresse induzido pelo meio osmótico e pelo bombardeamento com micropartículas.

Finalmente, os calos foram transferidos para frascos de vidro contendo meio de regeneração MS, suplementado com 30 mg/L de geneticina, com pH ajustado para 5.8, e expostos à luz sob fotoperíodo de 16 horas.

Foram realizados dois experimentos distintos de transformação genética via biolística utilizando como alvo calos embriogênicos. Em cada experimento foram utilizadas 12 placas de

Petri contendo 60 calos, sendo metade das placas bombardeada com os vetores pHA9+AQUA 01\_SI e outra metade com os vetores pHA9+AQUA 03\_SI.

### 3.6.3 Transformação de discos foliares de cana-de-açúcar

Discos foliares foram mantidos no escuro durante 15 dias, em meio MS<sub>3</sub>C, antes de serem transferidos para meio MS<sub>3</sub>C acrescido de 250 mg/L de ceftazidima e 150 mg/L de ácido cítrico. Os discos foram dispostos em círculos sobre papel filtro autoclavado (6x6cm). Em seguida, os discos foliares foram bombardeados com partículas de tungstênio cobertas com 10.0 µg de DNA dos vetores de transformação contendo os genes de interesse, sendo 5.0 µg do vetor pHA9 e 5.0 µg de um dos vetores AQUA 01\_SI ou AQUA 03\_SI.

Após receberem os disparos, os discos foram mantidos no escuro por cinco dias antes de serem transferidos para meio de regeneração MS acrescido de 150 mg/L de ácido cítrico e 30 mg/L de geneticina. O pH do meio de regeneração foi ajustado para 5.8 e os discos ficaram expostos à luz sob fotoperíodo de 16 horas.

Foram realizados quatro experimentos distintos de transformação genética via biolística utilizando como alvo discos foliares. Nos três primeiros experimentos foram utilizadas 12 placas de Petri, contendo oito discos foliares cada. Em cada experimento, seis placas foram bombardeadas com os vetores pHA9+AQUA 01\_SI e seis placas com os vetores pHA9+AQUA 03\_SI.

No quarto experimento foram utilizadas 24 placas de Petri, contendo sete discos foliares cada. Foram bombardeados os vetores pHA9+AQUA 01\_SI em 12 placas, enquanto as outras 12 foram bombardeadas com pHA9+AQUA 03\_SI.

### 3.6.4 Ensaio histoquímico

O gene *uidA* é utilizado em experimentos de transformação como gene marcador, sendo sua expressão considerada um indício de que a transformação genética foi efetiva. Este gene codifica a enzima β-glucuronidase, uma hidrolase capaz de clivar o substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-glucuronídeo (X-gluc) na presença de oxigênio e formar um precipitado azul (LACORTE, 1998). A visualização de pontos azuis em folhas bombardeadas pode ser um indício de expressão transiente do gene.

Neste trabalho, o vetor pFF19G, que possui a região codificante do gene *uidA* isolado de *E. coli*, foi utilizado como controle positivo da metodologia adotada (JEFFERSON; KAVANAGH; BEVAN, 1987). Para tal, folhas de tabaco foram imersas em solução contendo X-gluc e incubadas a 37°C por 24 horas. Após este período, as folhas foram descoloridas em etanol absoluto durante 24 horas, seguido de 48 horas em uma solução etanol 70%.

### **3.7 Isolamento de ácidos nucleicos**

Para o isolamento de ácidos nucleicos, folhas de plantas de cana-de-açúcar foram destacadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, maceradas e armazenadas em freezer a -80°C. O DNA genômico foi isolado de plantas que regeneraram em meio seletivo após o processo de transformação, enquanto que o RNA foi isolado de plantas transgênicas confirmadas por PCR.

Para isolamento de RNA, foi sempre selecionada a quarta folha expandida da base para o ápice das plantas *in vitro*.

#### 3.7.1 Isolamento de DNA genômico

O DNA genômico foi isolado das folhas maceradas utilizando o método CTAB, descrito por Doyle e Doyle (1987), para confirmação da inserção dos transgenes por PCR.

As amostras de DNA genômico foram quantificadas por eletroforese em gel de agarose 0.8%, corado com 0,001% (v/v) de brometo de etídio, em tampão de corrida TAE 1x (40mM Tris-acetato; 1mM EDTA) com tensão constante de 100V. Como padrão de referência para quantificação foi utilizada uma solução com 50 ng/ $\mu$ L de  $\lambda$  DNA (Invitrogen™).

#### 3.7.2 Isolamento de RNA total

O RNA total foi isolado das folhas maceradas utilizando o reagente TRIzol®, comercializado pela empresa Invitrogen™, de acordo com a metodologia descrita por Chomczynski e Sacchi (1987).

Após a extração do RNA total, todas as amostras foram tratadas com 1 $\mu$ L de Dnase I Amplification Grade (Invitrogen™), seguindo as recomendações do fabricante. Após a digestão do DNA, as amostras de RNA foram purificadas por re-extração com TRIzol® para evitar



possíveis interferências residuais da DNase no processo de síntese de cDNA. Após a purificação, a integridade das amostras de RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1.0%, corado com brometo de etídio (0,002% v/v), em tampão de corrida TAE 1x (40mM Tris-acetato; 1mM EDTA), com tensão constante de 150V.

O RNA total purificado foi quantificado por espectrofotometria de absorção, utilizando o equipamento Thermo NanaDrop® 1000 (Uniscience).

### 3.8 Confirmação do estado transgênico das plantas por PCR

Para a confirmação da inserção do cassete marcador seletivo do vetor pHA9 e do cassete de silenciamento foram desenhados os primers descritos na Tabela 1. O par de primers 440-441, utilizado para a confirmação da inserção do marcador seletivo, anela numa região do promotor Ubi-1 e numa região do gene *npt-II* (Figura 4). Para detecção da inserção do cassete de silenciamento foi utilizado o par de primers PI (promotor-íntron), o qual anela numa região do promotor 35S e numa região do íntron PDK, ambas flanqueando o inserto senso (Figura 5).

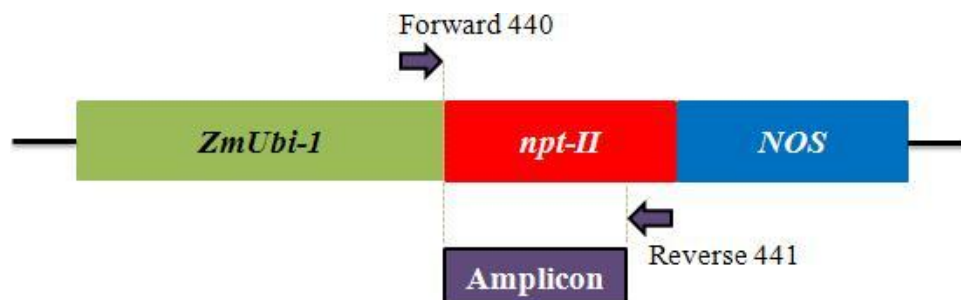


Figura 4 - Diagrama de alinhamento dos primers 440 direto e 441 reverso

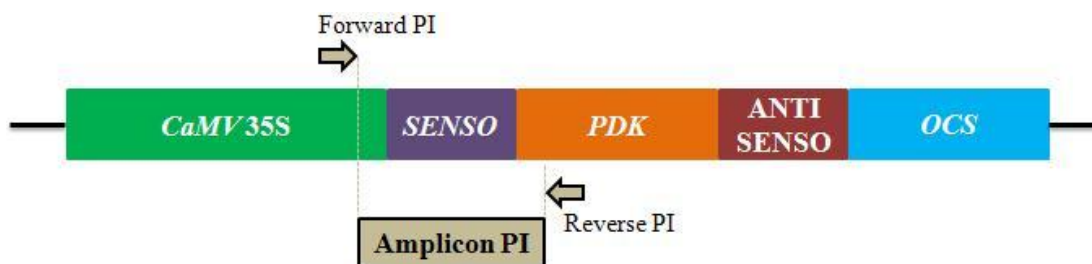


Figura 5 - Diagrama de alinhamento dos primers PI direto e PI reverso

Tabela 1 - Sequência dos primers utilizados para confirmação da inserção dos transgenes

Identificação	Sequência dos primers	Tamanho do amplicon (pb)
440 (F)	5'...CTGTGCTCGACGTTTCACT...3'	450 (p/pHA9)
441 (R)	5'...AGCCAACGCTATGTCCTGAT...3'	
PI (F)	5'...GCATCGTGGAAAAAGAAGACGTT...3'	470 (p/AQUA 01_SI)
PI (R)	5'...TTATCTTCTTCGTCTTACACATCACTTGTC...3'	543 (p/AQUA 03_SI)

As reações foram realizadas em um volume de 25  $\mu$ L, contendo 2.0 ng de DNA genômico ou 1.0 ng de DNA plasmidial (no controle positivo); 2.5  $\mu$ L de tampão Taq KCl 10x (100mM Tris-HCl pH 8.8; 500mM KCl; 0.8% (v/v) Nonidet P40); 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0.2 mM de cada dNPT; 0.2  $\mu$ M de cada primer e 1.5U de *Taq* DNA Polymerase (recombinant) (Fermentas).

As reações foram conduzidas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems™) a 94°C por 5 min; seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 45 s e 72°C por 45 s; finalizando a 72°C por 10 min. A resolução das reações foi feita por eletroforese em gel de agarose 1.5%, em tampão TAE 1x, sob tensão constante de 100V.

### 3.9 Análise de expressão gênica via RT-PCR

#### 3.9.1 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada a partir de 1,5 $\mu$ g do RNA total purificado. O cDNA foi sintetizado com o kit SuperScript® II Reverse Transcriptase da Invitrogen™, seguindo as recomendações do fabricante para síntese a partir de oligo DT.

#### 3.9.2 Normalização da concentração de cDNA nas amostras

Para a normalização das amostras foi utilizado o gene de expressão constitutiva *SspRPL35-4*, responsável pela síntese da proteína L35-4 que compõe a subunidade ribossomal 60S (CALSA JR.; FIGUEIRA, 2007).

O primer *rpl35* direto (forward) possui 20 nucleotídeos e sua sequência é 5'...CTGAAGACGGAGAGGGAAAA...3'. O primer *rpl35* reverso (reverse) possui 21 nucleotídeos e sua sequência é 5'... GGCGAAGAGAACTAACACCA...3'. O amplicon gerado por esse par de primers é de 264 pb.

As reações foram realizadas em um volume de 25  $\mu$ L, contendo cDNA das amostras avaliadas; 2.5  $\mu$ L de tampão Taq KCl 10x; 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0.2 mM de cada dNPT; 0.2  $\mu$ M de

cada primer e 1.5U de *Taq* DNA Polymerase. Os ciclos de amplificação da PCR foram definidos em: 94°C por 5 min; seguido de 24 ciclos de 94°C por 20 s, 58°C por 30 s e 72°C por 30 s; finalizando a 72°C por 10 min.

A resolução das PCRs se deu por eletroforese em gel de agarose 3.0%, em tampão TAE 1x, sob tensão constante de 130V.

### 3.9.3 Análise de expressão dos genes *SspTIP1;1* e *SspPIP1;4*

Após a normalização das amostras de cDNA foi verificado o nível de expressão dos genes alvos. O vetor Aqua 01\_SI tem como alvo para silenciamento o gene *SspTIP1;1* (SCCCRZ1001F02.g, número SAS) que codifica uma aquaporina da subfamília TIP. O vetor Aqua 03\_SI tem como alvo para silenciamento o gene *SspPIP1;4* (SCCCRZ1002E08.g, número SAS) que codifica uma aquaporina da subfamília PIP. Para analisar o nível de expressão destes genes após a transformação foram desenhados pares de primers que se anelam próximo a região 3' do gene alvo do cassete de silenciamento (Tabela 2).

Tabela 2 - Sequência dos primers utilizados para análise dos níveis de expressão dos genes alvo

Identificação	Sequência dos primers	Tamanho do amplicon (pb)
TIP (F)	5'...CTCGCATCGTTTGCTTTCTT...3'	107 (p/ <i>SspTIP1;1</i> )
TIP (R)	5'...CGTGGGACTCGGTGAATACT...3'	
PIP (F)	5'...CATCCCATTCAAGAGCAGGT...3'	136 (p/ <i>SspPIP1;4</i> )
PIP (R)	5'...GAACGGAGGAACTCCACGTA...3'	

As reações foram realizadas em um volume de 25 µL, contendo cDNA das amostras avaliadas; 2.5 µL de tampão Taq KCl 10x; 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0.2 mM de cada dNPT; 0.2 µM de cada primer e 1.5U de *Taq* DNA Polymerase. As reações foram conduzidas a 94°C por 5 min; seguido de 24 ciclos de 94°C por 20 s, 58°C por 30 s e 72°C por 30 s; finalizando a 72°C por 10 min.

A resolução das PCRs se deu por eletroforese em gel de agarose 3.0%, em tampão TAE 1x, sob tensão constante de 130V.



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análise *in silico*

No início deste estudo, os dois genes selecionados (AQUA1 e AQUA3) não possuíam anotação completa no banco de dados SUCEST, onde eram classificados apenas quanto à família gênica. Para preencher esta lacuna foi realizada uma análise *in silico* visando a classificação destes genes por similaridade com genes homólogos presentes em outras espécies vegetais, como *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), arroz (*Oryza sativa*) e sorgo (*Sorghum bicolor*). Além dos dois genes selecionados, foram analisadas as sequências de outros quatro genes pertencentes à superfamília MIP (SCCCST3001H12.g, SCEQRT2100B02.g, SCJFRT1059C11.g, SCEQRT1024B11.g) anotados no banco de dados SUCEST.

As seqüências de nucleotídeos dos genes de cana-de-açúcar foram comparadas com as seqüências disponíveis no banco de dados público NCBI (National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A busca foi feita através da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (ALTSCHUL *et al.*, 1990), utilizando a variação BLASTx deste software. Dentre as seqüências de aminoácidos obtidas após a busca, foram selecionadas as que pertenciam à superfamília gênica MIP e que apresentavam menor e-value.

Não houve retorno de nenhuma seqüência similar aos genes SCEQRT2100B02.g e SCJFRT1059C11.g após a busca com BLAST. Conseqüentemente, esses genes não foram analisados.

Em seguida, a anotação das seqüências de nucleotídeos dos genes de cana-de-açúcar iniciou-se pela busca do quadro de leitura destas seqüências, conhecido como ORF (Open Reading Frame) com uso da ferramenta ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>).

Conhecendo o início e o final da seqüência codificante de cada gene de cana-de-açúcar, a mesma foi traduzida com o programa Expasy (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>).

Tendo em mãos as seqüências de aminoácidos dos genes de cana-de-açúcar e dos genes homólogos de *arabidopsis*, arroz e sorgo, foi feita a busca pelos domínios conservados



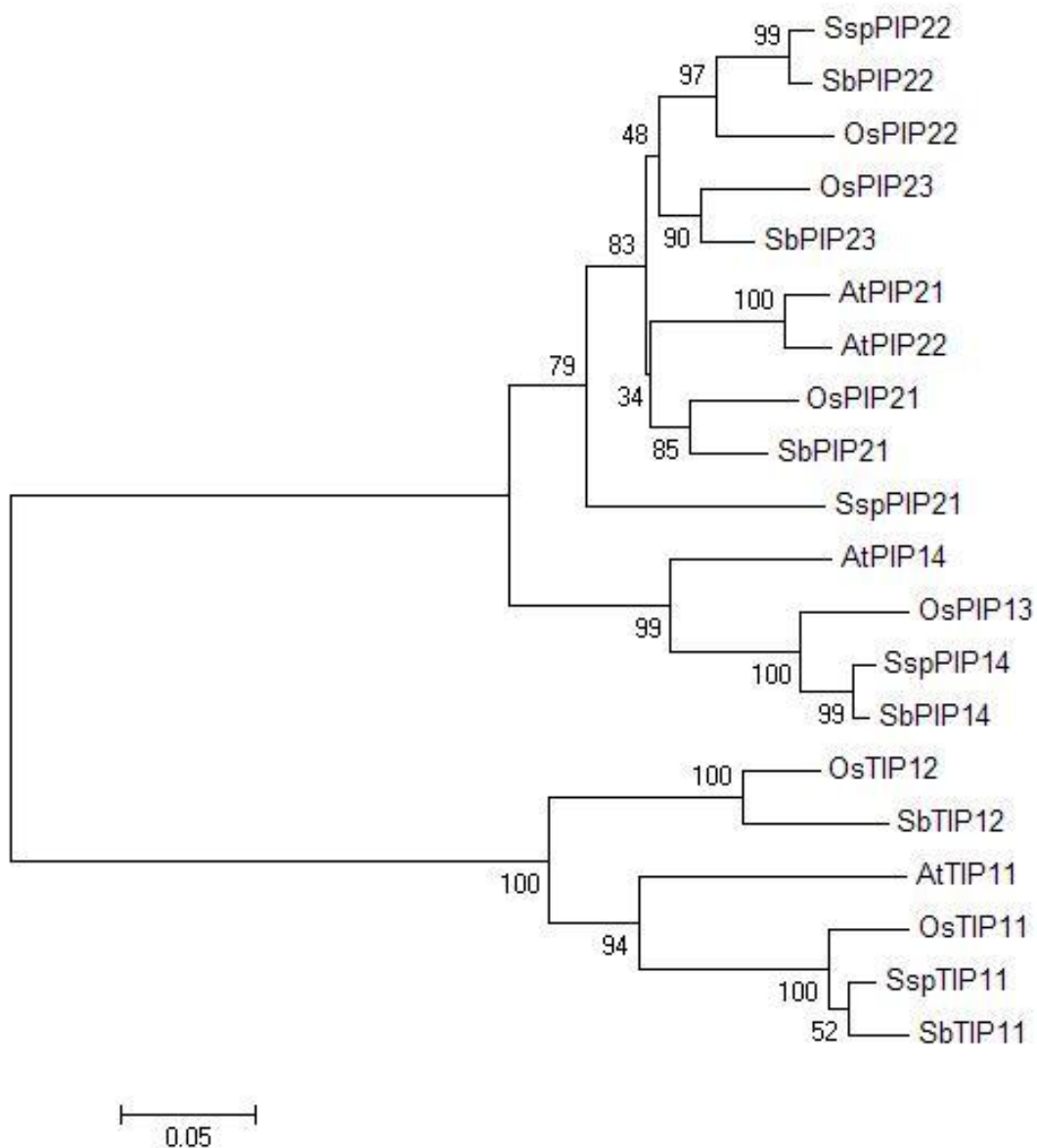


Figura 8 - Dendrograma de similaridade entre genes MIP

Com bases na análise filogenética foi possível identificar o gene AQUA 01 (SCCCRZ1001F02.g) e AQUA 03 (SCCCRZ1002E08.g) como homólogos aos genes já classificados em arabidopsis e arroz, *TIP1;1* e *PIP1;4*, respectivamente.

## 4.2 Transformação genética

### 4.2.1 Transformação de calos de cana-de-açúcar

Nos dois experimentos realizados visando a transformação genética de calos de cana-de-açúcar, houve sucesso na regeneração de plantas em meio seletivo no experimento 2. Neste experimento, para os disparos realizados com os vetores pHA9+AQUA 01\_SI, foram obtidas duas plantas com possibilidade de serem transgênicas (Tabela 3)

Tabela 3 – Regeneração de plantas oriundas de calos em meio seletivo com geneticina

<b>Experimento</b>	<b>Disparos realizados</b>	<b>Disparos AQUA 01_SI + pHA9</b>	<b>Disparos AQUA 03_SI + pHA9</b>	<b>Regenerantes Observados</b>	<b>Regenerantes AQUA 01_SI</b>	<b>Regenerantes AQUA 03_SI</b>
1	12	6	6	0	0	0
2	12	6	6	2	2	0
Total	24	12	12	0	2	0

#### 4.2.2 Transformação de discos foliares de cana-de-açúcar

Houve êxito na regeneração de plantas em meio seletivo no experimento 4 da série de experimentos realizados para transformação genética de discos foliares de cana-de-açúcar. Neste experimento 43 plantas foram regeneradas em meio seletivo, sendo seis plantas obtidas após os disparos com os vetores pHA9+AQUA 01\_SI e 37 plantas obtidas após os disparos com os vetores pHA9+AQUA 03\_SI (Tabela 4).

Tabela 4 – Regeneração de plantas oriundas de discos foliares em meio seletivo com geneticina

<b>Experimento</b>	<b>Disparos realizados</b>	<b>Disparos AQUA 01_SI + pHA9</b>	<b>Disparos AQUA 03_SI + pHA9</b>	<b>Regenerantes Observados</b>	<b>Regenerantes AQUA 01_SI</b>	<b>Regenerantes AQUA 03_SI</b>
1	12	6	6	0	0	0
2	12	6	6	0	0	0
3	12	6	6	0	0	0
4	24	12	12	43	6	37
Total	60	30	30	43	6	37

### **4.3 Confirmação do estado transgênico das plantas por PCR**

#### 4.3.1 Número de plantas transgênicas obtidos



Foram obtidas 45 possíveis plantas transgênicas, sendo duas oriundas de calos e 43 de discos foliares. Após o isolamento do DNA genômico, foi realizada a confirmação da integração do transgene no genoma das plantas regeneradas em meio seletivo, com o auxílio da técnica de PCR.

Inicialmente foi testada a integração do gene marcador *npt-II*. Em todas as 43 plantas que regeneraram em meio com 30 mg/L de geneticina, oriundas de discos foliares, o cassete de expressão do gene marcador seletivo *npt-II* foi integrado. Já as duas plantas oriundas de calos embriogênicos foram consideradas como escapes, uma vez que o gene marcador não foi detectado. Desta forma, não foi possível a obtenção de plantas transgênicas regeneradas a partir de calos embriogênicos neste trabalho.

Em seguida, as plantas selecionadas foram testadas quanto à integração do cassete de silenciamento gênico. Para o vetor AQUA 01\_SI, foram obtidas seis plantas a partir de discos foliares. Dentre as seis, ocorreu a integração do cassete de silenciamento AQUA 01\_SI em três plantas (Figura 9, colunas 6, 7 e 8).

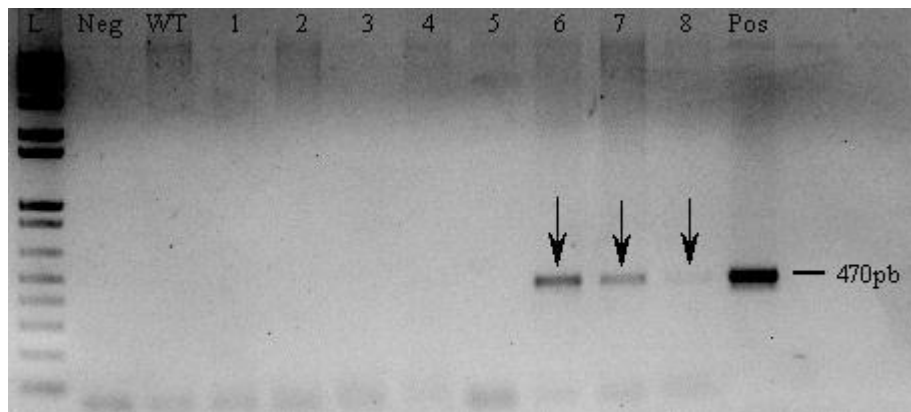


Figura 9 - Gel de PCR com primers PI das plantas regeneradas AQUA 01\_SI

Nos disparos realizados com os vetores pHA9+AQUA 01\_SI, ocorreu a integração do gene *npt-II* nas seis plantas que regeneraram em meio seletivo e co-integração do gene *npt-II* e do cassete de silenciamento AQUA 01\_SI em três plantas.

Com os disparos efetuados para a incorporação do vetor AQUA 03\_SI foram obtidas 37 plantas transgênicas, todas regeneradas a partir de discos foliares. A integração do cassete de silenciamento AQUA 03\_SI ocorreu em 10 plantas (Figura 10).

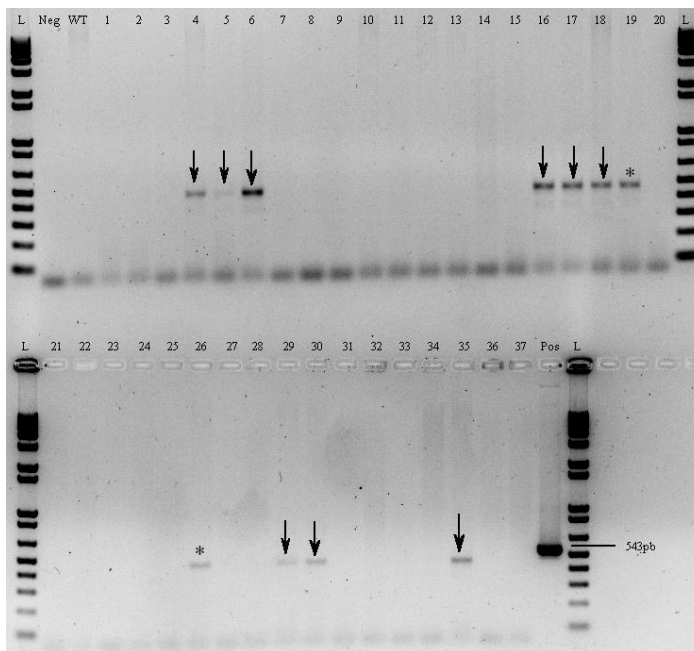


Figura 10 - Gel de PCR com primers PI das plantas regeneradas AQUA 03\_SI  
\* Plantas distintas da mesma linhagem transgênica

#### 4.3.2 Eficiência de transformação

A eficiência de transformação foi calculada baseando-se no total de plantas em que ocorreu a integração concomitante do gene *npt-II* e do cassete de silenciamento AQUA 01\_SI ou AQUA 03\_SI em relação ao número de disparos efetuados.

Foram obtidas 43 plantas transgênicas para o gene *npt-II*, e 13 plantas transgênicas para o gene *npt-II* e para um dos cassetes de silenciamento gênico (três plantas para AQUA 01\_SI e 10 plantas para AQUA 03\_SI) (Tabela 5).

A eficiência global de transformação genética via biolística de discos foliares de cana-de-açúcar foi de 2.85%. Foram obtidas aproximadamente 0.22 plantas transformadas com o gene de interesse por disparo realizado.

Tabela 5 – Eficiência de co-transformação dos experimentos de transformação genética com discos foliares de cana-de-açúcar

Transformação com discos foliares	Nº de Placas bombardeadas	Nº de discos bombardeados	Nº de brotos resistentes a geneticina	Total de plantas <i>npt-II</i> integrado	Total de plantas <i>npt-II/AQUA_SI</i> integrados	Eficiência de co-transformação (%) <sup>A</sup>
1	12	96	0	0	0	0
2	12	96	0	0	0	0
3	12	96	0	0	0	0
4	24	168	43	43	13	7,74
Total	60	456	43	43	13	2,85

<sup>A</sup> A eficiência de co-transformação (%) é calculada dividindo o total de plantas transgênicas *npt-II* e AQUA\_SI pelo número de discos foliares bombardeados.

#### 4.4 Análise de expressão gênica via RT-PCR

##### 4.4.1 Níveis de expressão do gene *SspTIP1;1* nas plantas transgênicas

Foram analisados os níveis de expressão do gene *SspTIP1;1* em duas plantas transgênicas nas quais a co-integração do gene *npt-II* e do cassete de silenciamento AQUA 01\_SI foi verificada.

A normalização da concentração de cDNA das amostras foi realizada por PCR para o gene de expressão constitutiva *SspRPL35-4*. Após a normalização das amostras, foi realizada uma PCR para o gene *SspTIP1;1* a fim de verificar se o cassete de silenciamento presente no vetor AQUA 01\_SI foi capaz de reduzir a expressão do gene alvo (Figura 11).

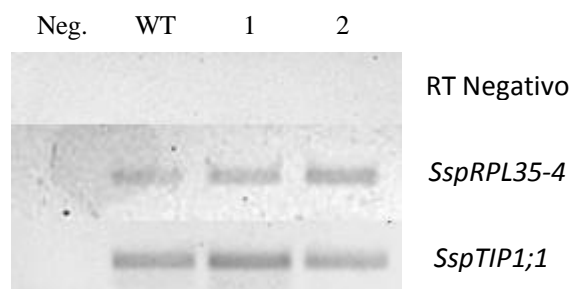


Figura 11 - Análise por RT-PCR do gene *SspTIP1;1* em plantas transgênicas AQUA 01\_SI

Nas duas plantas transgênicas avaliadas, a observação das bandas no gel de agarose não indicou qualquer modificação no padrão de expressão do gene *SspTIP1;1*, em relação à planta controle não transformada (Figura 11). Uma provável razão para este resultado é a ausência de

expressão do transgene nas plantas selecionadas. Neste trabalho não foi possível a análise de expressão dos transgenes, a qual será realizada futuramente.

#### 4.4.2 Níveis de expressão do gene *SspPIP1;4* nas plantas transgênicas

A análise dos níveis de expressão do gene *SspPIP1;4* foi realizada em cinco das 13 plantas transgênicas em que foi confirmada a inserção do gene *npt-II* e do cassete de silenciamento AQUA 03\_SI.

A normalização da concentração de cDNA das amostras e a análise de expressão do gene *SspPIP1;4* foi realizada como descrito no item anterior.

Pelos dados observados da análise de expressão, há diferença entre a expressão do gene *SspPIP1;4* nas linhagens transgênicas AQUA 03\_SI-8, AQUA 03\_SI-9 e AQUA 03\_SI-13 em relação a planta controle não transformada (Figura 12). Para a linhagem AQUA 03\_SI-9 há uma diferença sensível na intensidade da banda observada no gel em relação à planta controle não transformada. Nas linhagens AQUA 03\_SI-8 e AQUA 03\_SI-13 não foi detectado nenhum produto de amplificação. Estes resultados indicam que nestas três linhagens houve redução na expressão do gene alvo *SspPIP1;4*.

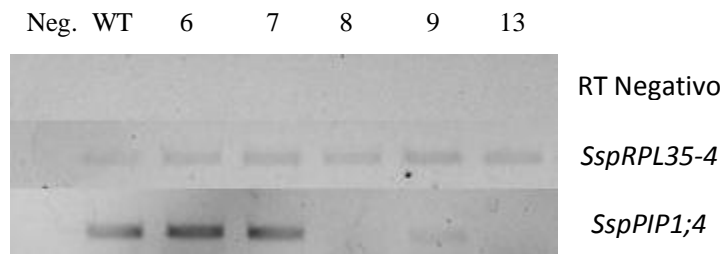


Figura 12 - Análise por RT-PCR do gene *SspPIP1;4* em plantas transgênicas AQUA 03\_SI

Nas linhagens AQUA 03\_SI-6 e AQUA 03\_SI-7, não há diferença significativa na intensidade das bandas observadas em relação à planta controle (Figura 12). Nestas plantas, não ocorreu modificação nos níveis de expressão do gene alvo *SspPIP1;4*.

## 5 DISCUSSÃO

A tecnologia de bombardeamento com micropartículas evoluiu como método para inserção de ácidos nucléicos exógenos em células vegetais e vem sendo empregada rotineiramente como técnica nos estudos em plantas.

No presente estudo, para cada disparo realizado foram obtidas 0.22 plantas transgênicas nas quais ocorreu a co-integração do gene seletivo e do cassete de silenciamento gênico. A integração apenas do gene seletivo ocorreu em maior frequência, sendo obtidas 0.72 plantas para cada disparo.

Bower e Birch (1992) obtiveram aproximadamente uma planta por disparo para a integração do gene *npt-II*. Gallo-Meagher e Irvine (1996) conseguiram 1.47 plantas por disparo com o gene *bar*. Ambos os estudos utilizaram calos embriogênicos como tecido-alvo. Falco *et al.* (2000), alcançaram uma eficiência de uma planta por disparo para co-integração dos genes *npt-II* e *bar*. Snyman *et al.* (2006), obtiveram 0.15 e 5.25 plantas por disparo para cultivar 88H0019, utilizando, respectivamente, discos foliares sem primórdios florais e discos foliares com primórdios florais.

O número de plantas transgênicas obtidas por disparo não são apresentados em outros estudos que empregam transformação de cana-de-açúcar via biobalística. Ainda, alguns desses estudos exibem o número total de eventos transgênicos obtidos e/ou a eficiência de transformação em porcentagem.

Neste estudo, ocorreu a co-integração do gene seletivo e do cassete de silenciamento gênico em 13 eventos de transformação. A eficiência de co-transformação alcançou 2.85%. Arvinth *et al.* (2010) obtiveram nove eventos para o gene *cryIAb* e uma eficiência de transformação de 10%. No estudo de Molinari *et al.* (2007), os autores conseguiram 17 eventos de transformação para o gene *P5CS*.

A eficiência de eventos obtidos por disparo nesse estudo é mais baixa que a relatada de forma geral na bibliografia, mesmo utilizando tecidos embriogênicos, o tipo de tecido mais empregado como alvo para produção de plantas geneticamente transformadas.

Taylor e Fauquet (2002), discutindo sobre bombardeamento de micropartículas, apontam para as principais desvantagens associadas ao sistema de cultura de tecidos embriogênicos, destacando-se a necessidade de pessoal qualificado para o início e a manutenção intensiva de

tecidos embriogênicos. De acordo com esses autores há um grande desafio em assegurar o suprimento constante de tecido com a qualidade exigida para inserção do transgene, sendo freqüentemente um fator limitante importante dentro de um programa para a obtenção de transgênicos.

No presente trabalho, os dois experimentos com calos embriogênicos e os três primeiros experimentos com discos foliares não conseguiram alcançar resultados satisfatórios. Nestes experimentos os principais contratempos enfrentados concernem à seleção inadequada de tecidos alvo e contaminação dos explantes *in vitro*, provavelmente devido à falhas na condução dos experimentos.

Nos experimentos de transformação com calos embriogênicos, mesmo após quatro subcultivos em meio seletivo ainda eram observados calos sobrevivendo em geneticina. No experimento 1, foram observados 257 fragmentos de calos após o quarto cultivo, enquanto que no experimento 2 foram contados 411 fragmentos. Deste grande número de fragmentos aparentemente resistentes a geneticina, foi obtida a regeneração de apenas duas plantas. O desenvolvimento dos calos em geneticina sugere uma integração do gene marcador em seu genoma. Entretanto, estes calos não apresentaram aptidão para regenerar plantas, não sendo possível a confirmação desta integração.

Falco *et al.* (1996), em seu estudo para caracterização da regeneração *in vitro* de cana-de-açúcar, classificou dois tipos de calos: um nodular, compacto, com pequenas células redondas, com citoplasma denso; e outro mais friável, translúcido, com grandes células alongadas. Os autores não observaram regeneração de plantas nos calos friáveis, independente do meio de regeneração testado. No presente estudo, provavelmente os calos selecionados para os experimentos de transformação genética não eram do tipo nodular e compacto. A ausência de regeneração de plantas transgênicas a partir de calos embriogênicos pode ser resultado da escolha incorreta dos melhores calos para a transformação.

Os melhores resultados deste trabalho de mestrado foram alcançados no experimento 4 de transformação de discos foliares. Neste experimento foi obtida a co-integração em 0.54 plantas por disparo, com uma eficiência de transformação de 7.74%. Esses valores foram 2.45 e 2.71 vezes maiores, respectivamente, quando comparados aos dados globais da série de experimentos.

No experimento 4, foi possível utilizar palmitos de cana-de-açúcar pré-florescidas em campo. Palmitos com primórdios florais foram utilizados em seis dos 24 disparos realizados. As

43 plantas regeneradas neste experimento são procedentes destes seis disparos. Snyman *et al.* (2006) relatam um aumento de 20 vezes na regeneração de plantas transgênicas comparando tecidos-alvo provindos de palmitos com primórdios foliares a outros provindos de palmitos sem primórdios florais, o que corrobora com as observações do presente estudo. A eficiência de transformação de plantas para estes seis disparos foi de 2.16 plantas por disparo. Apesar das maiores eficiências de transformação serem alcançadas utilizando explantes com primórdios florais (GALLO-MEAGHER; IRVINE, 1996; SNYMAN *et al.*, 2006) estes não são uma alternativa viável para o desenvolvimento de um sistema de transformação genética de cana-de-açúcar, uma vez que sua ocorrência é esporádica e dependente de condições ambientais estritas que precedem a indução do florescimento.

O desenvolvimento de protocolos eficientes para a transformação genética deve ser focado, primeiramente, na determinação de condições ótimas de cultivo *in vitro* para as cultivars que serão empregadas. Dentro deste âmbito, além das condições de cultivo, Taylor e Fauquet (2002) recomendam a utilização de genótipos modelos para transformação. O momento adequado para realização do disparo também deve ser bem definido. Franklin *et al.* (2006) constataram a formação de estruturas globulares compostas de células meristemáticas após 10 dias em meio de regeneração. Desai *et al.* (2004) e Snyman *et al.* (2006) verificaram a formação de embriões em um período de quatro semanas, sendo observados típicos estágios globulares e cordiforme após duas e quatro semanas de cultivo. O disparo deve ser feito antes da formação do embrião, pois além da célula estar menos protegida, diminui a possibilidade do surgimento de tecidos quiméricos.

Nas linhagens AQUA 01\_SI-1 e AQUA 01\_SI-2, bem como nas linhagens AQUA 03\_SI-6 e AQUA 03\_SI-7, não ocorreu redução na expressão dos genes alvos, respectivamente *SspTIP1;1* e *SspPIP1;4*. O processo de bombardeamento de partículas causa integração do transgene em regiões aleatórias ao longo do genoma da planta, mesmo quando são incluídas regiões homólogas na seqüência transferida (PUCHTA, 1998), levando ao que é conhecido como efeito de posição. Neste caso, os transgenes são inseridos em regiões altamente condensadas da cromatina e não serão expressos por tornarem-se metilados ou serão expressos em níveis baixos do que os transgenes integradas e regiões do genoma ativamente transcritas. Nas linhagens obtidas no presente estudos em que não ocorreu redução na expressão dos genes alvo, o cassete de silenciamento possivelmente integrou-se em regiões altamente condensadas da cromatina.

## 6 CONCLUSÕES

- Houve maior eficiência na regeneração de plantas transgênicas de cana-de-açúcar quando discos foliares foram utilizados como alvo para o disparo;
- A co-integração do gene *npt-II* e do cassete de silenciamento em 13 plantas, demonstrando que o método utilizado para transformação é viável, apesar de ser necessária otimização do mesmo;
- A redução dos níveis de expressão do gene *SspPIP1;4* nas linhagens transgênicas AQUA 03\_SI-8; AQUA 03\_SI-9 e AQUA 03\_SI-13 em relação ao controle não transformado, é um indício que o silenciamento gênico via RNAi está sendo disparado pelo cassete de silenciamento inserido no genoma destas plantas;
- Nas linhagens transgênicas em que não ocorreu redução na expressão dos genes alvo, possivelmente o cassete de silenciamento foi inserido em regiões altamente condensadas das cromatina.





## REFERÊNCIAS

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.

ARAGÃO, F.J.L.; RECH, E.L. Isolamento de vetores para transformação direta. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-Cenargem, 1998. p. 17-34.

ARENCIBIA, A.D.; VAZQUEZ, R.L.; PRIETO, D.; TELLEZ, P.; CARMONA, E.R.; COEGO, A.; HERNANDEZ, L.; DE LA RIVA, G.A.; SELMAN, H.G. Transgenic sugarcane plants resistant to stem borer attack. **Molecular Breeding**, New York, v.3, p. 247-255, 1997.

ARENCIBIA, A.D.; CARMONA, E.R.; TELLEZ, P.; CHAN, M.T.; YU, S. M.; TRUJILLO, L.; ORAMAS, P. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Transgenic Research**, New York, v. 7, n. 3, p. 213-222, 1998.

ARVINTH, S.; ARUN, S.; SELVAKESAVAN, R. K.; SRIKANTH, J.; MUKUNTHAN, N.; KUMAR, P.A.; PREMACHANDRAN, M. N.; SUBRAMONIAN, N. Genetic transformation and pyramiding of aprotinin-expressing sugarcane with cry1Ab for shoot borer (*Chilo infuscatellus*) resistance. **The Plant Cell Reports**, New York, n. 29, p.383–395, 2010.

BARBOSA, A.L. **Regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos e discos foliares visando transformação genética de cana-de-açúcar** (*Saccharum* spp.) 2010. 64 p. Dissertação Mestrado (Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

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

CALSA JR., T.; FIGUEIRA, A. Serial analysis of gene expression sugarcane (*Saccharum* spp.) leaves revealed alternative C<sub>4</sub> metabolism and putative antisense transcripts. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.63, p. 745-762, 2007.

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

CHEN, W.H.; DAVEY, M.R.; POWER, J.B.; COCKING, E.C. Control and maintenance of plant regeneration in sugarcane callus cultures. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 39, n. 2, p. 251-261, 1988.

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.

CHOMCZYNSKI, P. E SACCHI N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 162, n. 1, p.156-159, 1987.

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.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar safra 2007/2008, terceiro levantamento, dezembro/2009**. Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília: Conab, 2009. 14p. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/>>. Acesso em 19 jan. 2010.

CONTINI, E.; GASQUES J.G.; LEONARDI, R.B.A.; BASTOS, E.T. Projeções do agronegócio mundial. **Revista de Política Agrícola**, Brasília, v.15, n. 1, p. 29-44, 2006.

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

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.

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

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

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

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

FAPRI. **World agricultural outlook: World Biofuels**. Center for Agricultural Rural Development – Iowa State University, 2007. Disponível em: <<http://www.fapri.iastate.edu/publicatons>>. Acesso em 04 ago. 2007.

FRANCOIS, I.; BROEKAERT, W.; CAMMUE, B. Diferent approaches for multi-transgene-stacking in plants. **Plant Science**, Amsterdam, v. 163, p.281-295, 2002.

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

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.

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

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

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

GRIVET, L.; ARRUDA, P. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. **Current Opinion in Plant Biology**, v.5, n. 2, p. 122-127, 2002.

HAMMOND, S.M.; BERNSTEIN, E.; BEACH, D.; HANNON, G.J. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila cells*. **Nature**, New York, v. 404, p. 293-296, 2000.

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

HOGARTH, D.M. Genetics of sugarcane. In: HEINZ, D.J. (Ed.). **Sugarcane improvement through breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 255-271.

HUTVAGNER, G.; SIMARD, M.J. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, New York, v.9, p. 22-32, 2008.

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.1187-1197. 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.

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

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

JUNQUEIRA, A.A.B.; DANTAS, B. A cana-de-açúcar no Brasil. In: MALAVOLTA, E. (Ed.). **Cultura e adubação da cana-de-açúcar**. São Paulo: Instituto Brasileiro de Potassa, 1964. p. 27-60.

LACORTE, C.  $\beta$ -Glucuronidase (GUS). In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CENARGEM, 1998. p. 127-142.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R.J.; AITKEN, K.S.; GROF, C.L.P.; BONNETT, G.D.; SMITH, G.R. Invited review: sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. **Vitro Cellular and Developmental Biology**, Gaithersburg, v. 41, n. 4, p. 345-363, 2005.

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

LEIBBRANDT, N.B; SNYMAN, S.J. Stability of gene expression and agronomic performance of a transgenic herbicide-resistant sugarcane line in South Africa. **Crop Science**, Madison, v.43, n. 2, p. 671-678, 2003.

LIMA, M.A.C.; GARCIA, R. de O.; MARTINS, G.S.; MANSUR, E. Morfogênese in vitro e susceptibilidade de variedades nacionais de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) a agentes seletivos utilizados em sistemas de transformação genética. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, n 1, p. 73-77, 2001.

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

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, p.134–143, 2004.

MARGIS, R.; FUSARO, A.F.; SMITH, N.A.; CURTIN, S.J.; WATSON, J.M.; FINNEGAN, E.J.; WATERHOUSE, P.M. The evolution and diversification of Dicers in plants. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 580, p.2442-2450, 2006.

MAPA. **Exportações brasileira de açúcar, novembro de 2009**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretária de Produção e Agroenergia, Departamento de Cana-de-açúcar e Agroenergia. Brasília: MAPA, 2009, 1p. Disponível em: <>. Acesso em: 8 dez. 2009.

MATSUOKA, S.; GARCIA, A.A.F.; ARIZONO, H. Melhoria de cana-de-açúcar. In: BÓREM, A. (Ed.). **Melhoramento Vegetal: melhoria de espécies cultivadas**. 2. ed. Lavras: Editora Ufla, 2005. p. 225-274.

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

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

NÓBREGA, J.C.M. E DORNELAS, M.C. Biotecnologia e melhoria de cana-de-açúcar. In: SEGATO, S.V.; PINTO, A.S.P.; JANDIROBA, E.; NÓBREGA, J.C.M. (Org.). **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: [s.n.], 2006. p. 39-56.

PAPINI-TERZI, F.S.; FELIX J.M.; ROCHA, F.R.; WACLAWOVSKY, A.J.; ULIAN, E.C.; CHABREGAS, S.M.; FALCO, M.C.; NIHIYAMA JR., M.Y.; VÊNCIO, R.Z.N.; VICENTINI, R.; MENOSSI, M.; SOUZA, G.M. The SUCEST-FUN Project: Identifying genes that regulate sucrose content in sugarcane plants. **Proceedings of International Society of Sugarcane Technologists**, Indooroopilly, v. 26, p.123-134, 2007.

PAPINI-TERZI, F.S.; ROCHA, F.R.; VÊNCIO, R.Z.N.; FELIX, J.M.; BRANCO, D.S.; WACLAWOVSKY, A.J.; DEL BEM, L.E.V.; LEMBKE, C.G.; COSTA, M.D.L.; NISHIYAMA JR., M.Y.; VICENTINI, R.; VINCENTZ, M.G.A.; ULIAN, E.C.; MENOSSI, M.; SOUZA, G.M. Sugarcane genes associated with sucrose content. **BMC Genomics**, v.10, p. 120, 2009.

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

PUCHTA, H. Towards targeted transformation in plants. **Trends in Plant Science**, London, v. 3, p. 77-87, 1998.

RECH, E.L.; ARAGÃO, F.J.L. BIOBALÍSTICA. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-Cenargem, 1998. p. 51-63.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Lawrence, v.4, p.406-425, 1987.

RIDESA. **Variedades RB de cana-de-açúcar. Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro**. Universidade Federal de São Carlos – UFSCar. Centro de Ciências Agrárias – CCA. Departamento de Biotecnologia Vegetal – DBV. Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar – PMGCA 1 CD-ROM.

SÉTAMOU, 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, n.2, p. 469-477. 2002.

SMITH, N.A.; SINGH, P.A.; WANG, M.B.; STOUTJESDIJK, P.A.; GREEN, A.G.; WATERHOUSE, P.M. Total silencing by intronsplined hairpin RNAs. **Nature**, Washington, v. 407, p. 319-320, 2001.

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

SITNIKOVA, T.; RZHETSKY, A.; NEI, M. Interior branch and bootstrap tests of phylogenetics. **Molecular Biology and Evolution**, Lawrence, v.12, p.319-333, 1995.

SMALL, I. RNAi for revealing and engineering plant gene functions. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v.18, p.148-153, 2007.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S.H. MEGA4: molecular evolutionary genetic analysis: software: version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v.24, p. 1596-1599, 2007.

TAYLOR, P.W.J.; DIKIC, S. Development of a in vitro culture technique for conservation of *Saccharum* spp. hybrid germplasm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 28, p. 69-78, 1993.

TAYLOR, N.J.; FAUQUET, C.M. Microparticle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology. **DNA and Cell Biology**, New Rochelle, v. 21, p. 963-977, 2002.

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**, Oxford, v.22, p. 4673-4680, 1994.

TOLIA, N.H.; JOSHUA-TOR, L. Slicer and the argonauts. **Nature Chemical Biology**, New York, v. 3, p.36-43, 2007.

USDA. **World sugar situation – may 2007**. United States Department of Agriculture. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/commodities.asp>>. Acesso em 05 ago. 2007.

VAIN, P.; MCMULLEN, M.D.; FINNER, J.J. Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. **The Plant Cell Reports**, New York, v.12, p. 84-88, 1993.

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

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.

WATSON, J.D.; BAKER, T.A.; BELL, S.P.; GANN, A.A.F.; LEVINE, M.; LOSICK, R.M. **Molecular biology of the gene**. 6<sup>th</sup> ed. San Francisco, CA: Benjamin Cummings, 2008. 880p.

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

WANG, A.Q.; DONG, W.Q.; WEI, Y.W.; HUANG, C.M.; HE, L.F.; YANG, L.T.; LI, Y.R. Transformation of sugarcane with ACC oxidase antisense gene. **Sugar Technology**, Amsterdam, v. 11, n 1, 39-43, 2008.

WESLEY, S.V; HELLIWELL, C.A.; SMITH, N.A.; WANG, M.B; ROUSE, D.T; LIU, Q; GOODING, P.S.; SINGH, S.P; D; STOUTJESDIJK, P.A; ROBINSON, S.P; GLEAVE, A.P.; GREEN, A.G; WATERHOUSE, P.M. Construct design for efficient, effective and highthroughput gene silencing in plants. **The Plant Journal**, Oxford, v. 27, n. 6, p. 581-590, 2001.

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

ZHANG, S-Z.; YANG, B-P.; FENG, C-L.; CHEN, R-K.; LUO, J-P.; CAI, W-W.; LIU, FH. Expression of the *Grifola frondosa* trehalose synthase gene and improvement of drought-tolerance in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Journal of Integrative Plant Biology**, London, v.48, p.453-459, 2006.