**Universidade de São Paulo**
**Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**

# Cultura de tecidos e regeneração de plantas transgênicas a partir de calos embriogênicos e de folhas imaturas de cana-de-açúcar

**André Luiz Barbosa**

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

**Piracicaba**
**2010**

**André Luiz Barbosa**
**Licenciatura em Ciências Biológicas**

# Cultura de tecidos e regeneração de plantas transgênicas a partir de calos embriogênicos e de folhas imaturas de cana-de-açúcar

**Orientador:**
**Profa. Dra. HELAINE CARRER**

**Dissertação apresentada para a 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**

Barbosa, André Luiz
Cultura de tecidos e regeneração de plantas transgênicas a partir de calos embriogênicos e de folhas imaturas de cana-de-açúcar / André Luiz Barbosa. - - Piracicaba, 2010.
64 p. : il.

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

1. Biolística 2. Cana-de-açúcar 3. Genes 4. Polimorfismo 5. Reguladores de crescimento vegetal I. Título

CDD 633.61
B238r

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

**Dedicatória**

Dedico este estudo e trabalho a meus pais

**Izaías Barbosa do Carmo** e **Dinalva Moreira Barbosa**,

a meus irmãos

**Maurício Moreira Barboza, Alberto Moreira Barboza** e **Izaías Moreira Barbosa**

pelo apoio e carinho e a

**Profa. Dra. Helaine Carrer**

por ter me recebido com carinho e incentivo.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora **Profa. Dra. Helaine Carrer** por me receber como orientado, pela amizade, pelas palavras de conforto, pela orientação, pela dedicação dispensada a mim.

Agradeço à **Valentina de Fátima de Martin** pela amizade, pelas palavras de conforto pelos inúmeros auxílios, pela dedicação dispensada a mim.

Agradeço a **Laudenir M. Prioli** pela amizade, auxílio e as palavras de conforto dispensadas a mim.

Agradeço ao Marcelo Rogalski, ao Daniel Ramiro, Antônio Francisco de Campos Amaral, ao Evandro Tambarussi, ao Fred Almeida de Jesus, ao Eduardo C. Picelli, à Danila M. Passarin, à Joice Brigati, à Simone Guidetti, à Keini Dressano, e todos àqueles que me auxiliaram neste período de dedicação ao desenvolvimento deste trabalho.
Agradeço aos amigos Gre, Débora, Sérgio, Leila, Mônica, Celso, César e a todos aqueles dispensaram palavras de conforto e amizade nesta empreitada.

DEUS seja Louvado!

# SUMÁRIO

RESUMO····· 9
ABSTRACT····· 11
1 INTRODUÇÃO····· 13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA····· 15
2.1 A planta cana-de-açúcar····· 15
2.2 Cultura de tecido de cana-de-açúcar····· 16
2.3 Transformação genética de cana-de-açúcar····· 20
2.4 Ácido caféico-*O*-metiltransferase····· 22
3 MATERIAL E MÉTODOS····· 25
3.1 Material Vegetal····· 25
3.2 Indução de Calos embriogênicos e regeneração de plantas····· 26
3.3 Embriogênese e regeneração direta de discos foliares····· 27
3.3.1 Pré-tratamento com a auxina 2,4-D····· 27
3.3.2 Pré-tratamento em meio MS3K····· 28
3.4 Transformação genética por biolística····· 29
3.4.1 Transformação de calos embriogênicos····· 31
3.4.2 Transformação de discos foliares····· 31
3.4.3 Análise de plantas transgênicas····· 32
3.4.4 Sequenciamento····· 33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO····· 35
4.1 Regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos····· 35
4.2 Pré-tratamento com 2,4-D····· 39
4.3 Pré-tratamento em meio contendo 2,4-D e cinetina (MS3K) ····· 46
4.4 Transformação genética por biolística····· 48
4.4.1 Calos····· 48
4.4.2 Discos foliares cultivados em meio de cultivados em meio de cultura MS8····· 49
4.4.3 Discos foliares cultivados em meio de cultura MS3K····· 51
4.4.4 Sequenciamento de DNA····· 53
5 CONCLUSÕES····· 55

REFERÊNCIAS ·····57

# RESUMO

## Cultura de tecidos e regeneração de plantas transgênicas a partir de calos embriogênicos e de folhas imaturas de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma monocotiledônea poliplóide, alógama que possui baixa taxa reprodutiva devido a dificuldade de florescimento. Devido estas características genéticas e fisiológicas os programas de melhoramento são longos e laboriosos. Alternativamente, modernas aplicações da biotecnologia visam contribuir com o desenvolvimento de novos cultivares. Neste trabalho estudou-se a metodologia de cultura de tecidos a partir de discos de folhas imaturas para o estabelecimento da cultura de calos embriogênicos e regeneração de plantas a partir dos calos embriogênicos e diretamente, a partir de folhas imaturas. O objetivo principal foi contribuir para o desenvolvimento de métodos eficientes para produção de plantas transgênicas a partir de calos e folhas imaturas, considerando-se a crescente necessidade de produção de novos cultivares com características agronômicas específicas. Diversas concentrações de 2,4-D e cinetina em meio MS foram testadas para o estabelecimento de calos altamente embriogênicos e para a indução da desdiferenciação celular nos discos foliares antecedendo a regeneração de plantas. Meios de cultura sem reguladores de crescimento (MS) e com a adição de BAP e ANA foram testados para a regeneração de plantas a partir de discos foliares. Calos embriogênicos com 12 a 20 semanas de cultivo produziram em média 3 a 5 plantas, em meio de regeneração MS. Folhas imaturas apresentaram elevado potencial de regeneração de plantas quando se utilizou 2,4-D em concentrações de 5 e 8 mg/L nos períodos de 5 e 8 dias no escuro. Houve indução a formação de embriões somáticos que resultaram em média 12 a 16 plantas por explante no período total de 7 a 10 semanas. Além disso, foi testado o pré-tratamento dos discos foliares em meio MS3K, contendo 2,4-D (3mg/L) e cinetina (0,1 mg/L), antes da transferência do discos para meio de regeneração MS. Os discos submetidos a este pré-tratamento durante 14, 21 e 28 dias apresentaram aumento significativo na eficiência de regeneração de plantas, variando em média de 41 a 50 plantas por disco foliar nas variedades RB835089 e RB855156. A redução no tempo para obtenção de plantas aliado ao aumento na média de plantas obtidas é a base para aumentar a eficiência de transformação genética de plantas. Experimentos de cotransformação dos genes *neo* e *comt(AS)*, foram realizados por biolística. Em plantas regeneradas a partir de folhas imaturas da variedade RB835486, as análises de PCR confirmaram a incorporação do gene marcador *neo* em 57 e 90% das plantas em meio seletivo com geneticina (30 mg/L), sendo que a maior eficiência de regeneração de transgênicos (90%) foi obtida no pré-tratamento com o meio MS3K. Das plantas transgênicas para o gene *neo*, 7 e 38% também foram confirmadas para a incorporação do gene *comt(AS)*. Nas plantas regeneradas a partir de calos embriogênicos em meio seletivo, as análises de PCR detectaram somente a incorporação do gene *neo*, o que ocorreu em 52% das plantas analisadas. Os resultados obtidos mostram que a cultura de discos de folhas imaturas para o processo de transformação genética por biolística é uma metodologia viável, rápida e menos onerosa, quando comparada com a cultura de calos embriogênicos.

Palavras-chave: COMT; Ácido caféico-O-metiltransferase; Reguladores de crescimento; Auxina; Citocinina; Cotransformação; Biolística

# ABSTRACT

## Plant tissue culture and regeneration of transgenic plants from embryogenic callus and immature leaves of sugarcane

Sugarcane is a polyploidy monocot and allogamous species that has low reproductive rate due to the difficulty of flowering. Because of these genetic and physiological characteristics breeding program takes long time and demand hard labor. Alternatively, modern biotechnology approaches contribute to the development of new cultivars. In this work we studied the methodology of plant tissue culture from immature leaf discs to establish callus culture and plant regeneration from those calli and from immature leaves, directly. The main objective was to contribute to the development of efficient methods to produce transgenic plants from callus and immature leaves, due to the growing need to produce new cultivars with specific agronomics traits. MS medium with different concentrations of 2,4-D and kinetin were tested to obtain highly embryogenic calli and to induce cellular dedifferentiation in the immature leaf discs prior to plant regeneration. Culture media without growth regulators (MS) and with the addition of BAP and NAA were tested for plant regeneration from leaf discs. Callus culture with 12 to 20 weeks resulted on average 3 to 5 plants on regeneration medium designed as MS. Immature leaves showed a high potential for plant regeneration when 2,4-D at concentrations of 5 and 8 mg/L in periods of 5 and 8 days in the dark. There were inducing of somatic embryos that resulted in average 12 to 16 plants per explant in the total period of 7 to 10 weeks. In addition, we tested the pre-treatment of leaf discs in MS3K medium which contain 2,4-D (3 mg/L) and kinetin (0.1 mg/L) before transfering to plant regeneration MS medium . The discs submitted to this pre-treatment for 14, 21 and 28 days showed significant increase in the efficiency of plant regeneration, with on average of 41 to 50 plants per leaf disc in varieties RB835089 and RB855156. The reduction of time to obtain plants coupled with the increase of plants obtained is the basis for increasing the efficiency of plant genetic transformation. Co-transformation with genes *neo* and *comt(AS),* were performed by biolistics. Plants regenerated from immature leaves of the variety RB835486, PCR analysis confirmed the incorporation of the *neo* selection marker gene in 57 and 90% of the plants on selective medium with geneticin (30 mg/L), the higher efficiency of transgenic plants (90%) was obtained on pre-treatment in MS3K medium. Transgenic plants for the *neo* gene, 7 and 38% were also confirmed for the incorporation of *comt (AS).* PCR analysis of candidates transgenic plants from callus growing on selective medium, revelled only the insertion of the *neo* gene, which occurred in 52% of the analyzed plants. The results of this work showed that the approach of using immature leaf discs to obtain plant genetic transformation by biolistics methodology is a viable, cheaper and faster than using embryogenic callus.

Keywords: COMT; Caffeic acid-O-methyltransferase; Growth regulators; Auxin; Cytokinin; Co-transformation; Biolistics

# 1 INTRODUÇÃO

A planta cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é a mais importante fonte de açúcar e de matérias-primas para a produção de etanol combustível. Desde o estabelecimento do Proálcool em 1975 pelo governo federal, o Brasil tem a produção do etanol totalmente baseada na cana-de-açúcar. Medidas governamentais de adição do álcool anidro combustível à gasolina, a introdução de veículos que permitem alternar entre etanol e a gasolina convencional e os recentes aumentos do preço do petróleo mundial têm refletido no país a perspectiva de consolidar-se como o principal produtor de combustíveis renováveis advindos da cana-de-açúcar. Também a preocupação ambiental se somou para valorizar o interesse mundial por novas fontes renováveis de energia.

O aumento da demanda de etanol e açúcar tem resultado na expansão da lavoura canavieira. A produção total de cana foi de 612,2 milhões de toneladas em 2009/10, com aumento de 7,1% em relação à 2008/09. A área de cultivo da cana foi de 7,53 milhões de hectares em 2009/10, e é estimado crescer neste próximo ano (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB). O sucesso do setor está baseado em cultivares adaptados às condições ambientais de cada região produtora, as quais são resultados dos programas de melhoramento genético convencional. Entretanto, a produção é influenciada por um grande número de fatores como presença de pragas e doenças além de condições ambientais de fertilidade do solo e deficiência hídrica.

A posição de destaque da cana-de-açúcar no país e o interesse pela economia mundial ampliaram o investimento em pesquisa e inovação tecnológica nesta cultura. O projeto de sequenciamento de genes expressos (SUCEST), o atual programa BIOEN ambos financiados pela FAPESP e o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) do Bioetanol financiado pelo CNPq são exemplos de investimento que estimulam o avanço do conhecimento e as aplicações biotecnológicas e moleculares em áreas relacionadas à produção de bioenergia no Brasil.

A habilidade em estimular células de tecidos de plantas a formarem órgãos ou plantas inteiras é uma poderosa ferramenta para obtenção de plantas transgênicas, contribuindo como uma alternativa aos programas de melhoramento genético. A cultura de tecidos de cana-de-açúcar

foi publicada pela primeira vez por Nickell, em 1964. Desde então, a técnica de obtenção de calos, embriogênese somática e regeneração de plantas vêm sendo aprimorada e com relevante utilização na propagação massal, na conservação dos recursos genéticos vegetais e na transformação genética. Vários métodos de transformação genética foram testados em cana-de-açúcar sendo a biolística, o mais eficiente método de inserção de genes de interesse nesta espécie.

Desde 1992 quando Bower e Birch obtiveram a primeira cana transgênica, vários são os genes inseridos e expressos em cana-de-açúcar. Atualmente, existem plantas transgênicas de cana-de-açúcar resistentes a herbicidas, a insetos, ao vírus do mosaico amarelo, à bactéria causadora da escaldadura das folhas, tolerantes ao déficit hídrico, com maior acúmulo de sacarose e produção de plástico biodegradável (pHBA) , 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.

Apesar dos avanços recentes, ainda faz-se necessário a otimização da metodologia de transformação genética de cana-de-açúcar considerando-se a crescente necessidade de produção de novos cultivares com características agronômicas específicas. Assim, neste trabalho estudou-se a metodologia de cultura de tecidos a partir de discos de folhas imaturas para o estabelecimento da cultura de calos embriogênicos e a regeneração de plantas a partir dos calos embriogênicos e diretamente, a partir de folhas imaturas com o objetivo principal de contribuir para o desenvolvimento de métodos eficientes para produção de plantas transgênicas a partir de calos embriogênicos e folhas imaturas.

.

# 2 REVISÃO BIBLIOBGRÁFICA

## 2.1 A planta cana-de-açúcar

No Brasil e no mundo muitas variedades comerciais de cana-de-açúcar são híbridos, obtidos através de cruzamentos entre as várias espécies existentes (SCARPARI; BEAUCLAIR, 2008). Atualmente, quase todos os estados brasileiros produzem cana-de-açúcar, mas o maior estado produtor ainda é São Paulo, com cerca de 60% da produção nacional (BRASIL, 2009). A cana-de-açúcar é a principal matéria-prima para fabricação de açúcares, álcool, bagaço para a produção de energia motora, elétrica, fabricação de papel e forrageira para alimentação animal (ARENCIBIA, 1998; BRASIL, 2010).

A cana-de-açúcar tem grande importância agronômica nas regiões tropicais e subtropicais, sendo cultivada em 20 milhões de hectares em mais de 90 países. A cultura da cana-de-açúcar é responsável por cerca de 60% de açúcar do mundo (KHAN et al., 2004; 2009). A cana-de-açúcar é uma cultura de rendimento importante em muitos países em desenvolvimento, devido ao seu alto valor comercial (NAZ, 2003).

A espécie *Saccharum officinarum* é base dos programas de melhoramento. Esta espécie tem a capacidade de acumular altos níveis de sacarose no colmo, entretanto é mais suscetível às doenças, o que levou às nações produtoras de cana a iniciarem programas de melhoramento através da hibridização. A espécie *S. spontaneum* contribui para os programas de melhoramento. Esta espécie apresenta características de vigor, alto perfilhamento, capacidade de rebrota e principalmente a capacidade de resistir à doença, como o mosaico. Devido à hibridização destas duas espécies de cana-de-açúcar a terminologia taxonômica dos cultivares contemporâneos da cana é *Saccharum* spp. (DANIELS; ROACH, 1987; SCARPARI; BEAUCLAIR, 2008).

A cana-de-açúcar é uma planta alógama. Em seu genoma há variação de 130 a 170 cromossomos, devido a isto, esta espécie apresenta característica poliplóide. O colmo é cilíndrico, extremamente liso, composto por nós, entrenós ou internódios (segmento acima do solo) que fornece sustentação às folhas e à inflorescência. As folhas são alternadas, opostas e presas aos nós dos colmos e podem ser divididas em superior (lâmina) e inferior (bainha) que envolve o colmo. A lâmina foliar é alongada e relativamente plana. A nervura central está presente por toda a folha e lhe fornece sustentação. A alta eficiência fotossintética da cana-de-açúcar é uma característica do seu crescimento. Igualmente ao milho e ao sorgo a cana-de-açúcar

é caracterizada no grupo das plantas de metabolismo $C_4$ ricas em cloroplastos (CASA GRANDE; VASCONCELOS, 2008).

## 2.2 Cultura de tecido de cana-de-açúcar

A cultura de tecido para regeneração de plantas de cana-de-açúcar pode ser potencializada por duas vias 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; DUKIC, 1993; FALCO et al., 1996; LAKSHMANAN et al., 2005; LAKSHMANAN et al., 2006a).

A embriogênese e organogênese somática podem atuar simultaneamente no processo de formação de calos (massa de células pouco ou não diferenciadas) embriogênicos de cana-de-açúcar (KHAN; KHATRI, 2006). A organogênese assim como a embriogênese somática podem ser direta ou indireta. A organogênese direta ocorre com formação de células do explante original chamado de organogênese direta e a organogênese indireta forma calos com crescimento desordenado. A Embriogênese somática forma embriões somáticos que também podem ocorrer diretamente do explante chamado embriogênese somática direta ou mais frequentemente estes embriões formam calos, chamado de embriogênese somática indireta. (NADAR et al., 1978; HO; VASIL 1983; ELLIOT, 2002; FRANKLIN, 2006; KHAN; KHATRI, 2006). Gallo-Meagher, English e Abouzid (2000) citam Ho e Vasil (1983) e relatam que o padrão de desenvolvimento dos calos embriogênicos de cana-de-açúcar não segue o mesmo padrão de embriões zigóticos.

O estabelecimento da metodologia de cultura de tecidos na cana-de-açúcar foi realizado por Nickell em 1964. Os explantes utilizados na cultura de tecido de cana-de-açúcar é o segmento transversal de tecidos jovens, meristema apical, lateral, raízes, etc (GEIJSKES et al., 2003; LAKSHMANAN, 2006b; KAUR; GOSAL, 2009). No relato de Lakshmanan (2006b) a cultura de calos foi desenvolvida há muito tempo e Ahloowalia e Maretzki (1983) foram os primeiros a apresentarem de forma contundente a regeneração de plantas através de embriões somáticos de cana-de-açúcar. Inúmeros são os trabalhos em cana-de-açúcar referente ao cultivo para diversas

variedades através da cultura de calos e meristemas com obtenção de altas taxas de multiplicação. Existem pelo menos dois tipos morfológicos de calos em cana-de-açúcar: os embriogênicos e os não-embriogênicos que diferem na forma em que suas células estão organizadas, o embriogênico apresenta embriões globulares organizados e o não embriogênico aparece desorganizado e com células alongadas (RODRÍGUEZ et al., 1995). Estes dois tipos de calos de cana-de-açúcar apresentam diferentes potenciais morfogênicos caracterizados por Lakshmanan (2006b) em três grupos (i) rígido, compacto e embriogênicos, (ii) macio, friável, semi-translúcido, mas não-embriogênicos, e (iii) mucilaginosos, macio e brilhante, mas não-embriogênicos. Falco et al. (1996) classifica os calos embriogênicos de cana-de-açúcar em dois tipos: i) nodular, compacto e ii) friável, translúcido. Em milho, outra monocotiledônea, os calos embriogênicos foram classificados em tipo I e os não embriogênicos em tipo II (PRIOLI; SÖNDAHL, 1989; FLUMINHAN; AGUIAR-PERECIN, 1998;). Lal (2003) relata a formação de calos brancos em 80% dos discos de folha de cana-de-açúcar cultivados em meio de cultura com 2,4-D.

O regulador de crescimento 2,4-D administrado no meio de cultura, além de açúcares e aminoácidos atuam na formação de calos via organogênese ou embriogênese somática (FALCO, 1996 et al., 2000; KHAN; KATRI, 2006; KAUR; GOSAL, 2009). As lâminas foliares da bainha de cana-de-açúcar são adequadas para a indução de calos embriogênicos em detrimento do limbo, pois, a eficiência de produção e de desenvolvimento do calo é dependente da idade e posição do explante na planta (LAKSHMANAN, 2006b). A produção de calos é obtida, geralmente, depois do cultivo de segmentos de folhas jovens de plantas de cana-de-açúcar, na presença de auxinas como 2,4-D (GALLO-MEAGHER; ENGLISH, ABOUZID, 2000; KHAN, 2009) ou picloran (FITCH; MOORE, 1990). Falco (1996) utilizou 2,4-D com água de coco no meio de cultura para induzir a formação de calos. O uso do 2,4-D ou ácidos clorofenoxiacéticos na indução de calos embriogênicos de cana-de-açúcar são muito superiores a outros reguladores de crescimento comumente utilizados, incluindo dicamba, para embriogênese somática em cana-de-açúcar (LAKSHMANAN, 2006b; KHAN et al., 2008).

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, e o tecido cresce como um calo indiferenciado com características embriogênicas e não embriogênicas (KHAN et al., 2009). Em muitos casos, embriões somáticos

em calos de cana-de-açúcar não têm bem desenvolvidos os meristemas da raiz, e a adição de citocininas produz múltipla germinação precoce (HO; VASIL, 1983; GALLO-MEAGHER; ENGLISH; ABOUZID, 2000). Na ausência de auxina no meio de cultura, a cinetina não promoveria nenhuma ou muito pouca divisão celular com capacidade de estimular a formação da planta inteira. (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998; AMASINO, 2005).

A regeneração a partir de calos pode ocorrer em meio desprovido de reguladores de crescimento quando na presença de luz dependendo do genótipo utilizado (TAYLOR et al., 1992; FALCO et al., 1996; PASSARIN, 2009), podendo ser potencializada por diferentes reguladores de crescimento (CHENGALRAYAN; ABOUZID; GALLO- MEAGHER, 2005; SUPRASSANA et al., 2005). Entretanto, como a resposta morfogênica é fortemente influenciada pelo genótipo, é fundamental que seja realizada adaptação dos protocolos em cada cultivar a ser utilizada (CIDADE et al., 2006). A regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos de cana-de-açúcar cultivados em meio suplementado com 2,4-D pode ser conseguida pelo uso de diferentes combinações de 2,4-D, cinetina e 6-BAP (6-benzilaminopurina) (LIMA et al., 2001). Praticamente todas as partes das plantas produzem calos organogênicos. Entretanto, folhas e inflorescências são muito prolíficas. Por isto, estes são os tecidos alvos privilegiados para uma rápida produção de calos (LAKSHMANAN, 2006b).

Diferentemente da rota organogênica, a rota embriogênica em folhas jovens de cana-de-açúcar é considerada um sistema mais eficiente e produtivo para a propagação clonal em larga escala. As plantas de cana-de-açúcar obtidas pela cultura de meristemas nas folhas jovens são consideradas geneticamente e fenotipicamente mais estáveis do que às produzidas a partir de calos (ELLIOT, 2002; FRANKLIN et al., 2006; LAKSHMANAN, 2006b). A formação de embriões somáticos nas folhas jovens de cana-de-açúcar pelo estímulo do regulador de crescimento 2,4-D nos primeiros dias de cultivo leva a uma sequência de eventos similares à embriogenia (DESAI et al., 2004; 2006; FRANKLIN et al., 2006)

A embriogênese somática direta ocorre a partir das folhas jovens de cana-de-açúcar na presença de reguladores de crescimento exógenos, sem a formação de calos. A folha jovem de cana-de-açúcar tem a capacidade em regenerar plantas pelo estímulo da parte aérea pela administração de BAP e pelo estímulo da rizogênese promovido pelo regulador ANA (ácido

naftaleno acético), após o pré-tratamento com 2,4-D estimulador de grande número de embriões somáticos (FRANKLIN, 2006b). As folhas jovens de cana-de-açúcar podem regenerar plantas na presença de luz via embriogênese indireta, com formação de calos, mas sem a necessidade de subcultivá-los e também pela ausência de reguladores de crescimento em meio de cultura na presença de luz. Este método de regeneração a partir da folha jovem sem subcultivo de calos, mas por embriogênese somática indireta é eficiente quando é administrado 2,4-D no cultivo dos discos foliares no escuro (SNYMAN, 2006).

Em relato de Lakshmanan et al. (2006a), citando Snyman (2000; 2006), a abordagem utilizando discos foliares com desenvolvimento, pela embriogênese indireta, com formação calos provenientes de embriões somáticos na superfície da lâmina foliar aumentou muito a eficiência da regeneração de plantas cana-de-açúcar na cultura de tecidos. O sistema discos foliares tem mostrado ser altamente sensível à embriogênese somática em cana-de-açúcar (GALLO-MEAGHER; IRVINE, 1996; DESAI et al., 2004) e, portanto, poderia também ser utilizada a cultura de tecidos de discos foliares para a transformação de variedades que são recalcitrantes à regeneração via subcultivo de calos (LAKSHMANAN, 2006a).

A ausência de calos para obtenção da cana-de-açúcar em cultura de tecido é o melhor método para produzir plantas idênticas aos clones parentais. Este método de produção oferece vantagens a partir dos explantes vegetais, folhas jovens de plantas jovens, quando comparado aos métodos que envolvem a cultura de meristemas apicais ou gemas laterais com formação de calos. As plantas jovens são fontes de tecido e seu uso, na cultura de tecido permite melhor preservação da variabilidade genética e possibilita preservar mais a integridade do genoma da planta (RAJESWARI et al., 2009; TAWAR et al., 2008). A regeneração de plantas de cana-de-açúcar a partir de explantes na presença de diferentes concentrações de reguladores de crescimento torna a utilização da folha jovem um material viável para germinação de uma planta inteira, devido à uniformidade e à menor taxa de variação somaclonal. A cultura de tecidos pode causar perturbações na organização do genoma. A falta desta estabilidade é um dos principais obstáculos na micropropagação e os fatores como genótipo e a fonte dos explantes e o método de propagação vegetativa podem ocasionar a ocorrência de variação somaclonal nas plantas regeneradas. (STEINMACHER, 2007; RAJESWARI, 2009).

## 2.3 Transformação genética de cana-de-açúcar

A transformação genética de cana-de-açúcar tem seu espaço em várias linhas de pesquisa e é amplamente estudada. A primeira planta de cana-de-açúcar geneticamente transformada foi obtida por Bower e Birch (1992), através da técnica de biolística utilizando calos de cana-de-açúcar como material alvo. As plantas transformadas obtidas continham o gene *neo*, que codifica para a enzima neomicina fosfotransferase II, a qual confere resistência a antibióticos aminoglicosídeos (canamicina e geneticina). No mesmo ano, Chowdhury e Vasil bombardearam calos embriogênicos de cana-de-açúcar com o gene *bar*, porém, não conseguiram regenerar nenhuma planta transgênica, provavelmente devido à idade e tipo de calo utilizado nos experimentos de transformação.

O uso das técnicas de cultura de tecido e de engenharia genética proporciona inúmeras possibilidades de introduzir genes de interesse agronômico, de resistência ao estresse biótico e abiótico (LAKSHMANAN et al., 2005). A introdução de genes exógenos em plantas pode ser feita através da *Agrobacterium tumefaciens* ou por métodos diretos como a eletroporaçãoo e a biolística. No relato de Arencibia et al. (1998) e Enriquez e Obrigón et al. (1998) protocolos de transformação genética com *Agrobacterium tumafaciens* foram desenvolvidos. Essa bactéria causa a doença galha da coroa, em que ocorre o processo de transferência natural de fragmentos de DNA bacteriano para o interior da célula vegetal, integrando-se ao genoma nuclear (WANG, et al., 2008; PASSARIN, 2009).

Atualmente, existem plantas transgênicas de cana-de-açúcar resistentes a herbicidas (CHOWDHURY; VASIL, 1992; FALCO, 1998), a insetos (PASSARIN, 2009), ao vírus 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).

O material vegetal mais utilizado para transformação genética de cana-de-açúcar por biolística são os calos embriogênicos provenientes de folhas jovens. Atualmente, os discos foliares (segmentos de folhas sobrepostas) de cana-de-açúcar é a nova abordagem como tecido alvo para o processo de transformação (DESAI, 2004; LAKSHMANAN, 2005; 2006a;

SNYMAN et al., 2006). Os discos foliares que regeneram plantas pela rota da embriogênese direta (sem formação de calos) que leva à regeneração de plantas em curto período de tempo é um método inovador. Os discos foliares neste processo formam embriões somáticos na superfície laminar e podem ser bombardeados antes ou depois de formados (ELLIOT, 2002; FRANKLIN, 2006). Outro método que usa os discos foliares como alvo de bombardeamento é o que regenera plantas por embriogênese somática indireta. Os discos foliares alvos não regeneram plantas a partir dos embriões somáticos formados na superfície da lâmina foliar, mas após este estádio, quando calos embriogênicos são formados a partir destes embriões (GEIJSKES, 2003; MULLEGADOO; DOOKUN-SAUMTALLY, 2005; SNYMAN, 2000; 2006; KHAN, 2009).

A biolística é 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 têm sido empregados em inúmeros trabalhos. A escolha do tecido alvo é um dos fatores fundamentais neste processo de transformação genética (GAMBLEY et al., 1993). Para cana-de-açúcar e demais monocotiledôneas, o promotor mais utilizado é o da ubiquitina (Ubi-1) do milho (CHRISTENSEN; QUAIL 1996; FALCO; SILVA-FILHO, 2003).

Pode-se utilizar um gene marcador de resistência a antibiótico para selecionar as plantas transformadas na cultura in vitro. Este marcador seletivo não necessariamente pode estar presente no mesmo cassete de construção do gene de interesse. Tanto o gene marcador seletivo e o gene de interesse podem estar em construções diferentes. Estas construções podem ser utilizadas em conjunto (cotransformação) para recobrir os microprojéteis a serem utilizados no bombardeamento do tecido alvo. O bombardeio de partículas é ainda o método de escolha para cotransformação genética com múltiplos genes, pois o método de bombardeio de micropartículas é altamente eficiente em particular para as espécies de monocotiledôneas e é conveniente usar um grande número de amostras (BOWER; BIRCH, 1992; LIMA 2001). A cotransformação na maioria das vezes resulta em eventos com forte ligação de muitos genes em um único local (WU et al., 2002; ALTPETER et al., 2005).

### 2.3.3 Ácido caféico-*O*-metiltransferase

Na cana-de-açúcar, a expressão do gene *ácido caféico-O-metiltransferase* (*comt*) pertencente à família das metiltransferases e regula a biossíntese de lignina, dentre outros. A maior expressão da COMT encontrada foi em internódios de cana-de-açúcar. A indução de um gene *comt* já foi descrita durante uma maturação do colmo e na regulação do teor de sacarose. É necessário avaliar a expressão gênica nos genótipos cana-de-açúcar e seu efeito na produção de lignina e na concentração de sacarose (PAPINI-TERZI, 2009). No milho (Zea mays) outra monocotiledônea foram geradas plantas transformadas com uma construção endógena com cDNA antisense da COMT (comtAS) (PIQUEMAL, 2002).

A biossíntese de lignina regula o processo de lignificação dos componentes intrínsecos da parede celular secundária das células em cana-de-açúcar e dicotiledôneas. As ligninas representam o segundo mais abundante biopolímero do planeta com 25 a 30% da biomassa terrestre, sendo superadas apenas pela celulose. As ligninas são polímeros vegetais derivados dos alcoóis hidroxicinamílicos p-coumarílico, coniferílico e sinapílico, também chamados de monolignóis. Funcionalmente, a rigidez e a hidrofobia dos polímeros de lignina são importantes para o suporte mecânico e esta é uma característica que provavelmente permitiu a melhor adaptação das plantas à vida terrestre, a condução de água e a defesa vegetal ao ataque de patógenos. Além disso, as ligninas parecem exercer um importante papel na deposição e sustentação de polissacarídeos da parede celular (RAMOS et al., 2001; SOUZA, 2007).

Economicamente, a presença de altos teores de ligninas em vegetais representa maior custo de produção ou baixa produtividade. Na obtenção da polpa de celulose e papel a partir da madeira, por exemplo, a lignina deve ser removida por meio de um tratamento químico severo, que é oneroso tanto em termos financeiros quanto ambientais. Na pecuária, os altos teores de ligninas em plantas forrageiras determinam uma baixa digestibilidade, caracterizando pastagens de baixa qualidade. Visando melhor compreender os mecanismos de regulação gênica envolvidos na biossíntese das ligninas, vários trabalhos têm buscado a caracterização de enzimas e genes envolvidos nessa rota metabólica. Esses estudos têm permitido a alteração do processo de lignificação por meio, por exemplo, da modulação da atividade enzimática pela inibição química ou pela expressão dos genes em orientação reversa ou antissenso. A compreensão e a manipulação dos elementos envolvidos na regulação desses genes possibilitará obter plantas com

teores de ligninas mais adequados aos diversos fins industriais ou à agropecuária (PAPINI-TERZI, 2009).

# 3 MATERIAL E MÉTODOS

## 3.1 Material vegetal

As variedades de cana-de-açúcar RB835089, RB855156 e RB835486 foram utilizadas nos experimentos de cultura de tecidos e transformação genética. Estas variedades apresentam alta produtividade e são plantadas comercialmente no Brasil. Linhagens de calos embriogênicos foram desenvolvidas e a metodologia de regeneração direta de plantas a partir de folhas jovens foi estabelecida e otimizada. Calos embriogênicos e folhas jovens foram utilizadas em experimentos de transformação genética e regeneração de plantas transgênicas.

Discos de folhas jovens de plantas de cana-de-açúcar entre 6 e 10 meses de idade foram utilizados como explantes para cultura de tecidos. Os explantes de plantas cultivadas no campo foram gentilmente fornecidos pela Universidade Federal de São Carlos (UFScar), RIDESA, Programa de Melhoramento Genético da cana-de-açúcar (www.pmgca.dbv.cca.ufscar.br), na Unidade Experimental de Araras-SP (BIOEN-FAPESP).

Figura 1 – Porção apical de uma planta de cana-de-açúcar (RB855156). A barra indica a região do segmento (10 cm) de folhas jovens sobrepostas (palmito), que é excisado e segmentado transversalmente em discos, para serem utilizados como explantes

Os experimentos foram conduzidos no Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC) do Departamento de Ciências Biológicas, Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, SP. Inicialmente, a porção apical (“ponteiros”) das plantas foi cortada e duas ou três folhas externas foram removidas. Um segmento cilíndrico de aproximadamente 10 cm (Figura 1), aqui denominado “palmito”, foi então cortado e removido. O palmito consiste de lâminas foliares imaturas e sobrepostas (Figuras 2A e 2B), que ficam localizadas logo acima do nó +1 e internódio +1, de acordo com o Sistema Kuijper (SCARPARI; BEAUCLAIR, 2008). Os palmitos foram colocados em água destilada autoclavada e transferidos para uma câmara de fluxo laminar. A seguir, eles foram imersos em

álcool comercial hidratado 70% (92,8° INPM). Após agitação manual vigorosa, 3 x 30 segundos, os palmitos foram transferidos para água destilada autoclavada em um frasco de 1 L para evitar a desidratação do tecido. Utilizando-se de pinças e lâminas de bisturi esterilizadas, os palmitos foram então cortados transversalmente em discos foliares de 2 a 3 mm de espessura (Figura 2B) e transferidos para solução de ácido cítrico (150 mg/L) para evitar oxidação. Ao final de 4 a 5 minutos os discos foliares foram colocados em contato com um papel de filtro esterilizado para retirar o excesso da solução de ácido cítrico e imediatamente transferidos para meio de cultura (BOWER et al., 1996).

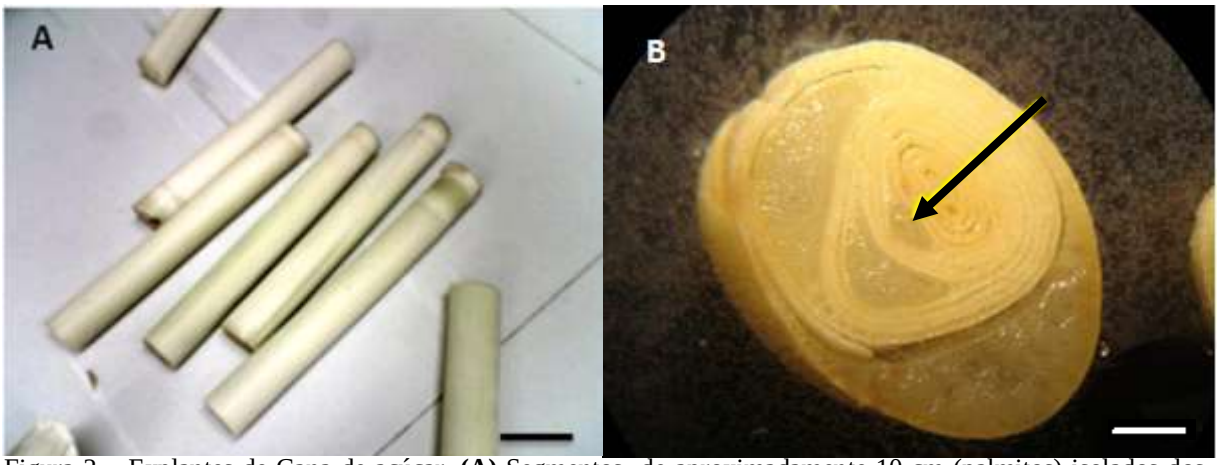


Figura 2 – Explantes de Cana-de-açúcar. **(A)** Segmentos de aproximadamente 10 cm (palmitos) isolados dos ponteiros; **(B)** Disco foliar (explante foliar) de 2 a 3 mm de espessura. A seta indicadas as lâminas foliares sobrepostas (barra=0,5cm)

O meio de cultura semi-sólido utilizado para indução de calos embriogênicos e regeneração direta de plantas a partir dos discos foliares consistiu dos sais e vitaminas do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com sacarose (30 g/L ) e Phytagel, da marca SIGMA (2,3 g/L). Este meio foi denominado de MS e, de acordo com o experimento, foi adicionado de reguladores de crescimento (auxinas e citocininas).

### 3.2. Indução de calos embriogênicos e regeneração de plantas

As variedades RB835089 e RB855156 foram utilizadas para indução de calos embriogênicos. O meio de cultura utilizado foi denominado de MS3K e consiste do meio MS suplementado com 2,4-D (3 mg/L) e cinetina (0,1 mg/L). O pH foi ajustado para 5,8. Após a autoclavagem e resfriamento do meio de cultura, adicionou-se o composto Clavulin® previamente filtrado, consistindo de amoxicilina (250 mg/L), que tem efeito bactericida, e clavulanato de

potássio (62,5 mg/L), que tem efeito bacteriostático, para evitar o desenvolvimento de bactérias no meio de cultura. As culturas foram incubadas no escuro em sala de ambiente controlado com temperatura ajustada para 27 ± 2°C.

O meio de cultura MS3K foi inoculado com 60 discos foliares de cada variedade, distribuindo-se 12 discos por placa. Esta fase de estabelecimento da cultura de calos é denominada de $R_0$. A cada 20 dias os discos foram subcultivados e transferidos para meio fresco até o estágio R2 (40 dias após o início), quando então, foram subcultivados novamente e mantidos por mais 20, 30 e 40 dias atingindo o estágio R3 com 60, 70 e 80 dias, respectivamente.

Com o objetivo de analisar a eficiência de regeneração de plantas dos calos formados em 60, 70 e 80 dias no meio MS3K no escuro, um experimento foi realizado transferindo-se os calos de cada período de cultivo e de cada variedade para o meio de regeneração MS sem reguladores de crescimento. As culturas foram mantidas na luz com fotoperíodo de 16 horas na luz e 8 horas no escuro, e temperatura 27 ± 2°C. Foram utilizados 320 calos, distribuídos uniformemente em 10 frascos para cada período de cultivo (60, 70 e 80 dias) e variedade.

Foram analisados os parâmetros de oxidação dos calos, características morfológicas dos calos como não-embriogênicos e embriogênicos, e a capacidade de regeneração de plantas dos calos embriogênicos classificados como friável, compacto-branco ou compacto-amarelo. Os calos foram subcultivados em meio de regeneração a cada 20 dias. A contagem das plantas com mais de 2 cm de altura foi realizada 90 dias após a transferência para meio de regeneração.

### 3.3. Embriogênese e regeneração direta de discos foliares

#### 3.3.1 Pré-tratamento com a auxina 2,4-D

Discos foliares das variedades RB835089 e RB855156 foram utilizados como explantes nos experimentos de regeneração direta de plantas com o objetivo de diminuir o tempo de obtenção de plantas e assim contribuir para o estabelecimento da tecnologia de transformação genética de cana-de-açúcar, reduzindo o tempo de obtenção dos transgênicos quando comparado com a transformação de calos embriogênicos. Os discos foliares foram obtidos e desinfestados conforme descrito no item 4.1.

Os discos foliares, perfazendo o total de 4032 de cada variedade, foram uniformemente distribuídos em um cultivo inicial em meio básico MS suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D: 5 mg/L (meio MS5); 8 mg/L (meio MS8) e 10 mg/L (meio MS10). As

culturas foram incubadas em condições de escuro a 27 ± 2°C. Após 5, 8 e 10 dias, 448 discos foliares de cada meio foram distribuídos em 14 combinações dos reguladores de crescimento BAP e NAA, designado como meios de regeneração. As concentrações de BAP testadas foram de 0,0; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; e 5,0 mg/L e de NAA foi de 0,1 mg/L . Foram distribuídos 32 discos (4 discos por frasco) nos 14 tratamentos de BAP/NAA: 1- 0/0; 2- 0,1/0; 3- 0,5/0; 4- 1,0/0; 5- 2,0/0; 6- 3,0/0; 7- 5,0/0; 8- 0/0,1; 9- 0,1/0,1; 10- 0,5/0,1; 11- 1,0/0,1; 12- 2,0/0,1; 13- 3,0/0,1; 14- 5,0/0,1mg/L. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas escuro a 27 ± 2°C. As plântulas regeneradas a partir de cada explante foram contadas aos 90 dias nos meios de regeneração. Cada plântula enraizada foi considerada um evento de regeneração.

Foram quantificados os discos que oxidaram após a transferência do meio de indução para o meio de regeneração. O número de plantas regeneradas por disco foi submetido à análise de variância (ANOVA) e fatorial a $p<0,05$ e $p<0,01$ de probabilidade, de acordo com a significância. As médias das variáveis analisadas foram comparadas pelo teste de Tukey a $p<0,05$ de probabilidade. As análises estatísticas deste experimento foram geradas pelo programa Assistat® 7.5 (SILVA; AZEVEDO, 2009).

### 3.3.2. Pré-tratamento em meio MS3K

Um total de 80 discos foliares das variedades RB835089, RB855156 e RB72454 obtidos e desinfestados conforme descrito no item 4.1, foram utilizados para avaliar a capacidade de regeneração direta de plantas. Os discos foram cultivados em placas de Petri contendo meio MS3K durante 7, 14, 21 e 28 dias em condições de escuro, a 27 ± 1°C. Após cada período de indução de calos, 20 discos foliares de cada período de incubação foram transferidos para meio básico MS sem reguladores de crescimento. Cada frasco com 2 discos foliares foi considerado uma repetição, totalizando 10 repetições neste experimento. Os frascos com os discos foram incubados sob fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas no escuro, a 27 ± 2°C. As plântulas regeneradas a partir de cada disco foliar foram avaliadas dentro de um período de até 90 dias. Cada planta enraizada representou um evento de regeneração. Foi considerado para análise o número de discos foliares que oxidaram e os que apresentaram regeneração de plantas enraizadas. Para a análise de eficiência de regeneração de plantas foi analisado o número total de plantas regeneradas pelo número total de discos foliares (20) de cada tratamento.

O número de plantas regeneradas por disco foi submetidos à análise de variância (ANOVA) e fatorial a $p<0,05$ e $p<0,01$ de probabilidade, de acordo com a significância. As médias das variáveis analisadas foram comparadas pelo teste de Tukey a $p<0,05$ de probabilidade. A análises estatísticas deste experimento foram geradas pelo programa Assistat® 7.5 (SILVA; AZEVEDO, 2009).

### 3.4 Transformação genética por biolística

Os experimentos de transformação genética nuclear de plantas de cana-de-açúcar foi realizado pela metodologia de biolística, utilizando o acelerador de partículas PDS 1000/ He (Biolistic® Particle Delivery System) Bio-RAD™. O plasmídeo pFF19G (TIMMERMANS et al., 1990) foi gentilmente fornecido pelo Dr. Pal Maliga, do Instituto Waksman na Rutgers, The State University of New Jersey, USA. Este plasmídeo contém o gene repórter uidA que expressa a enzima β-glucoronidase (GUS) sob o controle do promotor CAMV35S (Figura 3) e foi utilizado para verificar a eficiência de adesão do DNA plasmidial às micropartículas como também a regulagem do acelerador de partículas pela expressão transiente da proteína GUS em folhas jovens de plantas de tabaco. As folhas de tabaco foram mantidas na sala de crescimento por 48 horas e em seguida incubadas com o substrato ácido 5-bromo-4-cloro-3indolil-β-D-Glucurônico (X Gluc) por 24 horas (JEFFERSON; KAVANAGH; BEVAN, 1987).

A formação de pontos azuis demonstra a expressão transiente do gene uidA (Figura 4). Considera-se que quanto maior o número destes pontos, maior será a probabilidade de transformação genética, por que espera-se que o mesmo número de células de cana-de-açúcar receba o gene de interesse

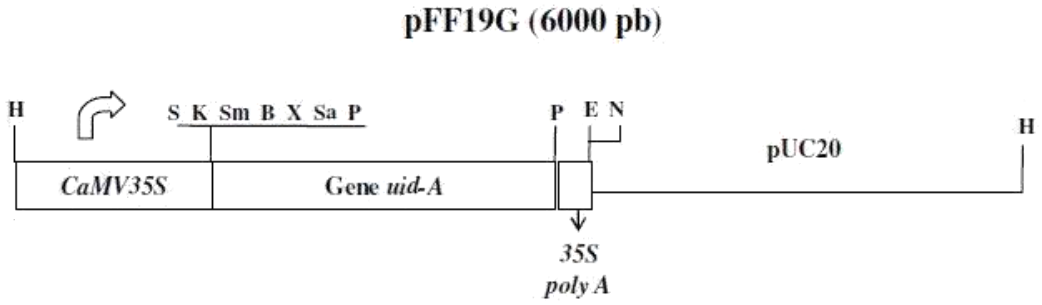


Figura 3 – Representação esquemática do plasmídeo pFF19G com o cassete de expressão do gene repórter *uidA*

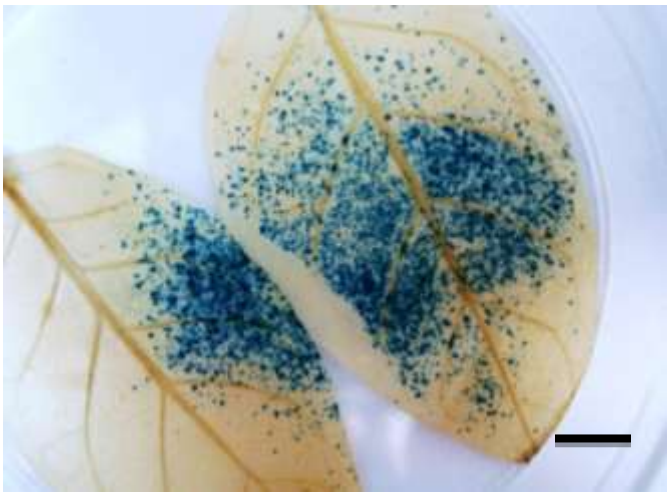

Figura 4 – Pontos azuis revelam a expressão transiente do gene *uidA* em folha de tabaco (barra = 1cm)

A transformação genética de calos embriogênicos e discos foliares foi realizada pela metodologia de cotransformação com os plasmídeos pHA9 e pAHC17-comt(AS) .

O plasmídeo pHA9 (Ubi-1 :: gene *neo* :: terminador *Nos*) contém o cassete de expressão do gene *neo*. Este plasmídeo é utilizado como marcador de seleção, pois confere resistência ao antibiótico geneticina (antibiótico aminoglicosídico) utilizado para seleção de transformantes de cana-de-açúcar (BOWER; BIRCH, 1992; FITCH; DE LA CRUZ; MOORE, 1995; FALCO et al., 2003). O outro plasmídeo utilizado foi o pAHC17-*comt(AS)* (Ubi-1 :: gene *comt(AS)* :: terminador *Nos*) clonado do cDNA (SCRFLR1012F12.g.) que codifica a proteína do ÁCIDO CAFÉICO 3-O-METILTRANSFERASE (COMT) obtido da base de dados do SUCEST (RAMOS et al., 2001; PAPINE-TERZI et al., 2007). Esta proteína pertence à superfamília das metiltransferases, acumulada em internódios maduros de cana-de-açúcar. Este gene atua na biossíntese da produção de lignina e pode ter um efeito na concentração de sacarose de cana-de-açúcar (PAPINI-TERZI, 2009; PIQUEMAL, 2002; RAMOS 2001). O vetor pAHC17 (CHRISTENSEN; QUAIL; 1996) é derivado do plasmídeo pUC18 e contém o promotor da ubiquitina de milho (Ubi-1) e a nopalina sintase na região 3 ' não traduzida. O vetor de transformação pAHC17-*comt(AS)* foi fornecido pela Profa. Gláucia Mendes de Souza, da Universidade de São Paulo, para obtenção de cana transgênica dentro do Programa Bioen-FAPESP.

Os dois plasmídeos utilizados para os experimentos de biolística possuem o gene de interesse sob controle do promotor Ubiquitina do milho (Ubi-1) de milho, com bons resultados de

expressão de genes heterólogos em cana-de-açúcar (BOWER; BIRCH, 1992; CHRISTENSEN; QUAIL, 1996; FALCO et al., 2003).

Em cada preparo da solução de bombardeamento foi adicionado 5 μg de cada plasmídeo para recobrir partículas de tungstênio M10 de 1 μm (GTE Sylvania Chemicals/ Metals). O preparo das partículas de tungstênio e da solução de transformação foi realizado pelo mesmo método descrito por Passarin (2009). Cada preparo permitiu a realização de seis disparos.

### 3.4.1 Transformação de calos embriogênicos

Foram utilizados 192 calos embriogênicos da variedade RB835456 em subcultivo R3 (60 dias no escuro) para a transformação genética. Os calos foram espalhados sobre papel de filtro (10x10 cm) autoclavado, até cobrirem a área central. Em seguida, cada papel de filtro contendo os calos foi colocado sobre meio de cultura osmótico composto pelo meio MS3K suplementado com 73 g/L de manitol e 73 g/L de sorbitol (VAIN *et al*. 1993), onde foi mantido durante quatro horas antes do bombardeamento. Após o bombardeamento, os calos permaneceram por mais 4 horas em meio osmótico e então foram transferidos para meio MS e incubados durante três dias em condições de luz com fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas escuro com temperatura ajustada para 27 ± 1°C. A seguir, os calos foram transferidos para meio de cultura MS contendo o agente seletivo geneticina (30 mg/L), mantendo-se as mesmas condições de luz e temperatura. Neste meio seletivo, foram colocados 32 calos por frasco, para a regeneração das plantas transgênicas.

### 3.4.2 Transformação de discos foliares

Nos experimentos de transformação genética em discos foliares por biobalística foram utilizados 180 discos da variedade RB835486. Antes da transformação por biolística, 90 discos foram cultivados por 8 dias no escuro em meio MS suplementado com 8,0 mg/L de 2,4-D denominado de MS8 e os outros 90 discos foram cultivados por 15 dias no escuro, em meio MS3K. No bombardeamento via biolística utilizou-se suspensão de tungstênio recoberta pelo DNA plasmidial pHA9 e pAHC17-comt(AS) preparados conforme descrito no item 4.4.

Neste processo de bombardeamento de discos de folhas jovens aproximadamente 15 discos foram agrupados sobre papel de filtro em placa de Petri com meio de cultura MS3K. Realizou-se 6 disparos em placas com discos foliares provindos do MS8 e outros 6 disparos nos discos foliares cultivados em MS3K. Imediatamente após o bombardeamento, grupos de quatro

discos foliares provenientes do MS8 foram transferidos para meio MS suplementado com 0,1 mg/L de BAP e os discos provenientes do meio MS3K foram transferidos para meio MS sem os reguladores de crescimento. Todos os explantes bombardeados foram colocados em sala de crescimento na luz com fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas escuro e temperatura a 27 ± 1°C. Após 3 dias os discos foram transferidos para os seus respectivos meios de regeneração de plantas suplementados com geneticina (30 mg/L) para a seleção dos transformantes.

### 3.4.3 Análise das plantas transgênicas

Amostras de tecidos das plantas enraizadas em meio seletivo com geneticina, tiveram o DNA genômico extraído pelo método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990) e quantificados pela comparação visual com a intensidade de fragmentos de concentrações conhecidas de 50, 100 e 200 ng de pGEM® (APLIED BIOSYSTEMS) em gel de agarose 1%. A confirmação da inserção dos genes *neo* e *comt* antisense no genoma das plantas candidatas foi determinada por amplificação dos fragmentos específicos de DNA pelo método de PCR (reação em cadeia da polimerase), utilizando-se primers referentes a cada gene.

Nas reações de PCR para amplificar o fragmento de 410 pb específico do gene da neo do genoma da planta transgênica foram utilizadas as sequências direta e reversa internas, pois não há referência da existência da sequência do gene neo no genoma da cana-de-açúcar:

Sequência neo direta: 5’ GAG GCT ATT CGG CTA TGA CTG 3’

Sequência neo reversa: 5’ TCG ACA AGA CCG GCT TCC ATC 3’

Para amplificar o fragmento de 320 pb do gene comt(AS) foram utilizadas as sequências direta que anelam no promotor da ubiquitina do milho que compõe o cassete presente no vetor de transformação pAHC17-comt(AS) e a sequência reversa que anela internamente na sequência do gene comt(AS).

Sequência Ubi direta: 5’ AGC CCT GCC TTC ATA CGC TAT TTA TTT GCT TGG TAC 3’

Sequência comt(AS) reversa: 5’ CTC GGT CAT CAT CAC CAA GAA GCT CCT CGA GTT 3’

Em todas as reações de PCR foi utilizado o DNA plasmidial como controle positivo (CP), o DNA genômico da variedade como controle negativo (CN) e $ddH_2O$ como o controle negativo da reação. Na reação de PCR para o gene *neo* foi utilizado o programa de ciclos como segue: 94 °C – 5 minutos para a denaturação inicial seguido por 40 ciclos com 94 ºC – 1 minuto; 58 °C – 40 segundos; 72 °C – 1 minuto. A extensão final foi a 75 °C – 10 minutos. Para o gene *comt(AS)* o

ciclo foi: 94ºC – 2 minutos para denaturação inicial seguido por 35 ciclos com 94 ºC – 30 segundos; 54 ºC – 30 segundos; 72 ºC – 40 segundos. A extensão final foi a 75 ºC – 10 minutos.

### 3.4.4 Sequenciamento

Algumas plantas possivelmente transgênicas, regeneradas a partir de discos foliares cultivados em meio MS3K, foram analisadas para a amplificação por PCR do fragmento de 313 pb correspondente ao inserto do vetor pAHC17-*comt(AS)* e apresentaram resultados da reação de PCR com banda fraca no gel de agarose. O fragmento de DNA de 313 pb de duas dessas plantas foi então sequenciado utilizando-se o primer comt(AS) reverso e o kit ABI DYEnamic ET da GE®, em um sequenciador 3100 *Genetic Analyzer* da *Applied Biosystems/Hitachi*.

# 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 4.1 Regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos

Esse experimento teve como objetivo determinar a capacidade regenerativa de calos embriogênicos no estágio R3 mantidos no meio de cultura MS3K por 60, 70 e 80 dias. Nesse estágio, os explantes permaneceram no mesmo meio de cultura por diferentes períodos (20, 30 e 40 dias) para determinar assim, qual o período de cultura no escuro que produz um maior número de plantas regeneradas no meio MS sem reguladores de crescimento, em presença de luz.

Neste experimento foram identificados os calos embriogênicos do tipo friável, compacto-branco e compacto-amarelo como responsivos à regeneração de plantas e os não embriogênicos do tipo vacuolado, macio e mucilaginoso incapazes de regenerarem plantas de cana-de-açúcar (Figura 5). Observou-se que o prolongamento da cultura durante o estágio R3 aumenta o número de explantes oxidados independentemente da variedade. Os valores de oxidação variaram de 4% e 8% aos 60 dias, para 12% e 18% aos 80 dias, respectivamente para as variedades RB835089 e RB855156. Para as duas variedades também foi obsevada uma diminuição da capacidade embriogênica com um aumento do número de calos não embriogênicos de 5% e 7% aos 60 dias para 33% e 26% aos 80 dias, respectivamente (Tabelas 1 e 2). É interessante notar que ocorre uma redução na formação de calos embriogênicos friáveis e compactos brancos (Figura 5-A e 5-B) com o aumento do período no estágio R3 (Tabelas 1 e 2). Porém a mesma tendência não é observada para os calos embriogênicos compactos amarelos que se mantêm constantes nos três diferentes períodos de cultivo. Embora, a percentagem de calos embriogênicos compactos amarelos se mantenha constante durante os três períodos testados, observa-se uma diminuição da capacidade embriogênica com uma redução no número de plantas regeneradas. Os calos do tipo embriogênico se mostraram capazes em regenerar plantas de cana-de-açúcar (Figura 6) como descrita por Falco (1996), Khan e Khatri (2006) e Lakshmanan (2006b).

Figura 5 – Características dos calos oriundos de explantes foliares de cana-de-açúcar. A-C: Calos embriogênicos **A)** Friável – Var. RB835089; **B)** Compacto-branco – Var. RB855156; **C)** Compacto-amarelo – Var. RB855156; D-F: Calos não-embriogênicos: **D)** Vacuolado – RB835089; **E)** mole – RB72454; **F)** Mucilaginoso – RB835089 ; imagens com barra = 0,5mm

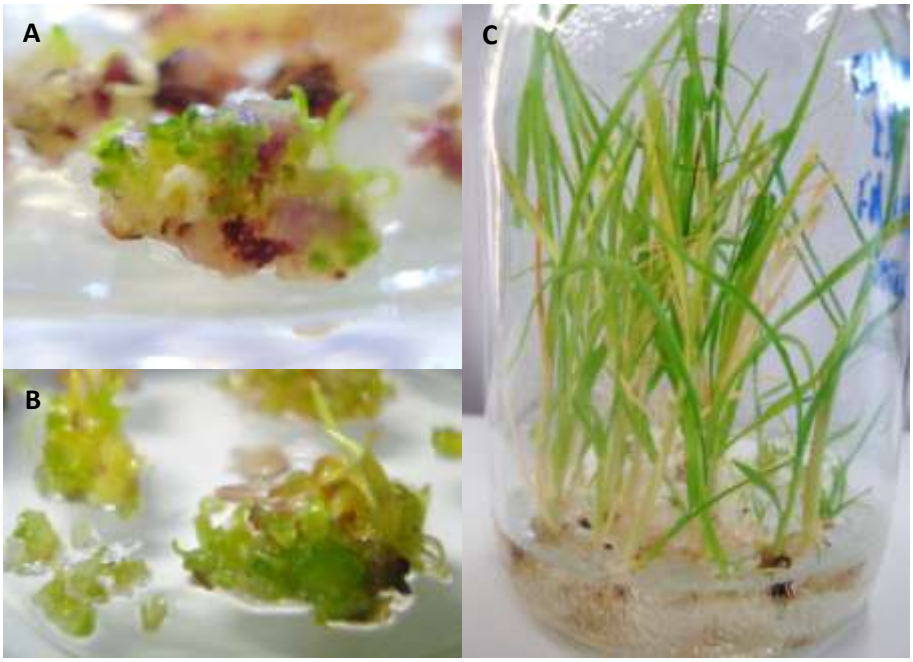


Figura 6 – A) calos embriogênico em início de processo de regeneração de plantas, 20 dias após a transferência para a luz; B) calos embriogênicos com plântulas em processo de desenvolvimento após 40 dias a transferência para luz; C) Plantas de cana-de-açúcar regeneradas com 3 meses em presença de luz

O aumento da permanência dos calos no estágio R3 também reduziu significativamente a média de plantas regeneradas independentemente da variedade. A variedade RB835089 apresentou redução no número de plantas para calos friáveis 3,21 (60 dias) para 2,85 (80 dias) e calos compacto-branco com 4,65 (60 dias) para 1,75 (80 dias) (Tabela 1). Essa tendência de redução na capacidade de regeneração de plantas no prolongamento de cultivo dos calos no escuro foi observada na variedade RB855156, porque também ocorreu uma redução no número de plantas de calos friáveis com 4,24 (60 dias) para 2,1 (80 dias) e calos compacto-branco com 4,19 (60 dias) para 3,0 (80 dias) (Tabela 2).

Os resultados desse experimento mostram que 60 dias é o mais adequado período de tempo para a cultura de calos embriogênicos durante o estágio R3 onde se obtém o maior número de plantas regeneradas para as variedades RB835089 e RB855156. Essa melhor resposta pode estar relacionada ao estresse gerado pelo aumento do tempo de cultivo no mesmo meio de cultura, ocasionado por desequilíbrio da constituição mineral e pelo próprio aumento da oxidação dos explantes (Tabelas 1 e 2). A redução na formação de calos embriogênicos em período de cultivo prolongado pode estar relacionada com a alteração na concentração de 2,4-D (CENGALRAYAN, 2005; LIMA, 2001), ocasionada pela oxidação no meio de cultura e pela absorção inicial por parte dos calos (LAKSHMANAN, 2006a).

Tabela 1 – Número de calos da variedade RB835089 oxidados, embriogênicos do tipo friável, compacto-branco e compacto amarelo e médias de plantas regeneradas a partir dos calos embriogênicos

| Período de cultivo RB835089 | Calos oxidados | Calos não embriogênicos | Calos embriogênicos | | | Média de plantas regeneradas por período de tempo de indução de calos embriogênicos no escuro | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Friável | Compacto-branco | Compacto-amarelo | Friável | Branco | Amarelo |
| 60 | 13 (4%) | 17 (5%) | 94 (29%) | 44 (14%) | 152(48%) | 3,21 ±0,04aA | 4,65 ± 0,98aA | 0,76 ± 0,05aB |
| 70 | 27 (8%) | 57 (18%) | 44 (14%) | 27 (8%) | 165 (52%) | 3,8 ± 0,32aA | 2,62 ± 0,63bB | 0,3 ± 0,04bC |
| 80 | 38 (12%) | 104 (33%) | 14 (4%) | 8 (2%) | 157 (49%) | 2,85 ± 0,7cA | 1,75 ± 1,12cB | 0,15 ± 0,01bC |

Média ± Desvio Padrão de regeneração de plantas para o Número de Dias de Cultivo no Escuro seguidos pela mesma letra minúscula (colunas) e de Característica de Calos embriogênicos seguidas pela mesma letra maiúscula (linhas) não diferem estatisticamente (Tukey ao nível de 5% de probabilidade); n = 10

Nos genótipos das variedades RB835089 e RB855156 analisados, observou-se a formação de embriões somáticos sobre a superfície dos calos embriogênicos duas semanas após a inoculação. Este mesmo período de tempo foi reportado por Snyman (2000; 2001 e 2006), para

calos provenientes de folhas imaturas de cana-de-açúcar. Diferentemente de Lakshmanan (2006b), os calos embriogênicos neste experimento foram classificados de maneira simplificada para uma fácil e rápida identificação: em friáveis (Figura 5-A) que facilmente se destacam da porção massal, como pequenos grânulos, em compacto-branco (Figura 5-B) são densos e duros em pequenas unidades e em compacto-amarelo (Figura 5-C) pela coloração, pouco densos e estão aglomerados em porções maiores. Os calos não embriogênicos mucilaginosos apresentaram praticamente a mesma nomenclatura descrita por Lakshmanan (2006b). Os resultados desse experimento mostram que 60 dias é o período de tempo para a cultura de calos embriogênicos durante o estágio R3 onde se obtém o maior número de plantas regeneradas para as variedades RB835089 e RB855156. Essa melhor resposta pode estar relacionada ao estresse gerado pelo aumento do tempo de cultivo no mesmo meio de cultura, ocasionado por desequilíbrio da constituição mineral e pelo próprio aumento da oxidação dos explantes (Tabelas 1 e 2). A redução do período de tempo durante o estágio R3 é importante pois reduz o tempo de contato dos explantes com o 2,4-D, diminuindo a probabilidade de variação somaclonal nas plantas regeneradas (RAJESWARI et al., 2009; STEINMACHER, 2007).

Tabela 2 – Número de calos da variedade RB855156 oxidados, embriogênicos do tipo friável, compacto-branco e compacto amarelo e médias de plantas regeneradas na luz a partir dos calos embriogênicos

| Período de cultivo RB855156 | Calos oxidados | Calos não embriogênicos | Calos embriogênicos | | | Média de plantas regeneradas por período de tempo de indução de calos embriogênicos no escuro | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Friável | Compacto-branco | Compacto-amarelo | Friável | Branco | Amarelo |
| 60 | 24 (8%) | 23 (7%) | 65 (20%) | 57 (18%) | 151 (47%) | 4,24 ± 0,51aA | 4,19 ± 0,79aA | 1,03 ± 0,17aB |
| 70 | 28 (9%) | 67 (21%) | 19 (6%) | 11 (3%) | 195 (61%) | 4,26 ± 2,85aA | 3,36 ± 4,42bB | 0,05 ± 0,04bC |
| 80 | 57 (18%) | 82 (26%) | 6 (2%) | 5 (1%) | 170 (53%) | 2,1 ± 1,01cB | 3 ± 2,62bA | 0,07 ± 0,03bC |

Média ± Desvio Padrão de regeneração de plantas para o Número de Dias de Cultivo no Escuro seguidos pela mesma letra minúscula (colunas) e de Característica de Calos embriogênicos seguidas pela mesma letra maiúscula (linhas) não diferem estatisticamente (Tukey ao nível de 5% de probabilidade); n = 10

Os compostos fenólicos liberados na cultura de tecido meristemático (KHAN; KHATRI, 2006) podem ser o fator de oxidação dos calos de cana-de-açúcar das variedades RB835089 e RB855156. Os calos de cana-de-açúcar do tipo embriogênico das duas variedades se mostraram capazes em regenerar plantas (Figura 6), como descrito por Falco (1996), Khan e Khatri (2006) e Lakshmanan (2006b), mesmo após um período de subcultivo prolongado (Tabelas 1 e 2). Os calos classificados neste estudo como compacto-branco, das variedades RB835089 e RB855156, correspondem ao mesmo tipo branco embriogênico descrito por Chengalryan, Abouzid e Gallo-Meagher (2005) e Khan e Khatri (2006), com capacidade de regenerar plantas.

Neste experimento, os calos do tipo compacto-amarelo cultivados por período prolongado no mesmo meio de cultura produziram menor quantidade de calos embriogênicos e menor número de plantas regeneradas. A redução da concentração de 2,4-D no meio de cultura pode ter sido um dos fatores que afetaram a capacidade de regeneração de plantas. Em estudos de Chengalryan, Abouzid e Gallo-Meagher (2005), foram reportados os do tipo branco, que foram subcultivados por 12 semanas em meio de mesma composição de nutrientes. Esses calos tornaram-se compacto-amarelo e embriogênicos, sugerindo haver uma dependência em relação à concentração de auxina. O efeito do 2,4-D administrado na cultura no escuro para induzir calos embriogênicos tem papel regulatório importante (KHAN; KHATRI, 2006), mas o genótipo pode influenciar no desenvolvimento dos calos (CIDADE et al., 2006), como também observado no presente estudo.

### 4.2 Pré-tratamento com 2,4-D

Nesse experimento objetivou-se determinar a capacidade regenerativa dos discos foliares de cana-de-açúcar pré-tratados com diferentes concentrações de 2,4-D, consistindo de 5 mg/L (MS5), 8 mg/L (MS8) e 10 mg/L (MS10) pelo período de 5, 8 e 10 dias no escuro. Após cada período, os discos foram transferidos para meio de regeneração, compreendendo 14 tratamentos com os reguladores de crescimento BAP/ANA, na presença de luz. Os efeitos da concentração de 2,4-D e tempo de escuro e também dos tratamentos BAP/ANA, visando o aumento da eficiência de regeneração, foram estimados considerando-se o número de plantas regeneradas.

O cultivo dos discos em 5 e 8 dias no escuro resultou em maior frequência de embriões somáticos diretamente a partir do tecido foliar, que ficaram bem evidenciados quando transferidos para o meio de regeneração na luz (Figura 7-A, B e C). No cultivo dos discos em 10

dias no escuro, para as variedades RB835089 e RB855156, notou-se o aumento na formação de calos em estádio de desenvolvimento inicial a partir do tecido foliar e a diminuição do número de embriões somáticos. A oxidação dos discos foliares foi variável para as variedades RB835089 e RB855156 (Tabelas 3 e 5) e alguns discos foliares com oxidação parcial regeneraram plantas no meio regeneração em presença de luz (Figura 7-E). Observa-se uma diminuição da capacidade embriogênica quando os discos foliares foram cultivados em 10 dias no escuro, com consequente redução no número de plantas regeneradas em meio de cultura MS com os reguladores de crescimento BAP e ANA, na presença de luz.

Os discos de folhas imaturas da variedade RB835089 apresentaram aumento significativo no número de plantas regeneradas após cultivo em meio de cultura MS8 durante 5 e 8 dias no escuro, quando comparados com os demais pré-tratamentos no escuro (Tabela 4). O resultado foi semelhante para a variedade RB855156, porém o aumento significativo no número de plantas regeneradas ocorreu apenas para o pré-tratamento em meio de cultura MS8 durante 8 dias no escuro, comparando-se com os demais pré-tratamentos (Tabela 6). O pré-tratamento em MS8 durante 8 dias no escuro teve um efeito positivo na eficiência de regeneração, resultando em aumento do número de plantas regeneradas nas concentrações 0,1 mg/L e 0,5 mg/L de BAP, independentemente da concentração de ANA. Nestas duas concentrações de BAP o número de plantas regeneradas das duas variedades foi significativamente mais alto. A variedade RB835089 produziu 36 plantas em 0,1/0,1 BAP/ANA e 20 plantas em 0,5/0,1 BAP/ANA (Tabela 4). Por sua vez, os discos foliares RB855156 resultaram em 23 plantas em 0,1/0,1 de BAP/ANA e 22 plantas em 0,5/0,1 de BAP/ANA (Tabela 5), após cultivo em MS8 durante 8 dias no escuro. No pré-tratamento 0,1/0 de BAP/ANA durante 5 dias foram regeneradas 37 plantas RB835089 (Tabela 4) e 12 plantas RB855156 (Tabela 6). Os discos foliares em 0/0,1 de BAP/ANA formaram raízes com geotropismo invertido, quando não oxidaram totalmente (Figura 7-D).

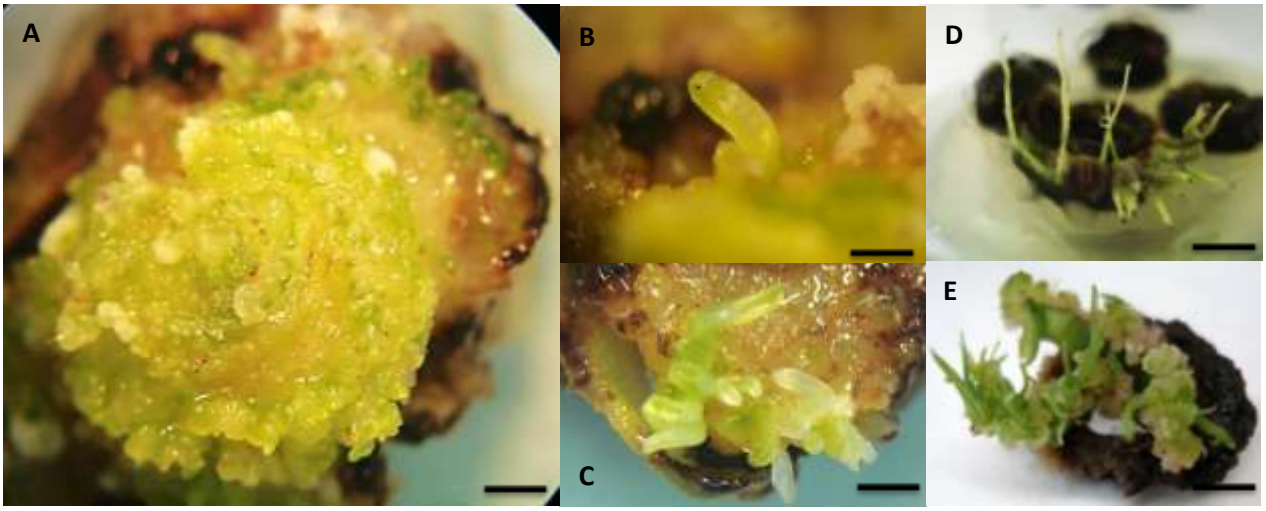


Figura 7 - A) Discos foliares com embriões somáticos e primórdios foliares; B) Detalhe de um embrião somático formado na superfície do disco foliar; C) Detalhe de embriões e primórdios foliares; D) Disco foliar em presença de luz regenerando raízes com geotropismo negativo e ausência de plantas, em meio MS regeneração com 0,1 mg/L de ANA; E) Disco foliar na luz apresentando oxidação parcial e brotos de cana-de-açúcar em meio MS suplementado com 0,1mg/L de BA; barras: A) 2,8 mm; B) 1,3 mm; C) 3 mm; D) 1,5 cm; E) 1cm

Tabela 3 – Total de discos foliares oxidados (DO) e de plantas regeneradas (PR) da variedade RB835089 de cana-de-açúcar após cultivo em meio MS em diferentes tratamentos com BAP e ANA na presença de luz, após pré-tratamento no escuro em diferentes concentrações de 2,4-D

| | RB835089 – Pré-tratamento 2,4-D | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 5 dias | | | | | | 8 dias | | | | | | 10 dias | | | | | |
| BAP/ANA | 5 mg/L | | 8 mg/L | | 10 mg/L | | 5 mg/L | | 8 mg/L | | 10 mg/L | | 5 mg/L | | 8 mg/L | | 10 mg/L | |
| | DO | PR | DO | PR | DO | PR | DO | PR | DO | PR | DO | PR | DO | PR | DO | PR | DO | PR |
| 0/0 | 32 | 0 | 32 | 0 | 32 | 0 | 32 | 0 | 32 | 0 | 32 | 0 | 32 | 0 | 32 | 0 | 32 | 0 |
| 0,1/0 | 23 | 103 | 24 | 133 | 28 | 9 | 18 | 373 | 3 | 398 | 21 | 43 | 23 | 18 | 31 | 6 | 27 | 3 |
| 0,5/0 | 24 | 36 | 29 | 27 | 30 | 6 | 24 | 73 | 14 | 228 | 29 | 17 | 26 | 7 | 30 | 4 | 30 | 0 |
| 1/0 | 29 | 0 | 28 | 1 | 28 | 0 | 29 | 0 | 17 | 4 | 30 | 0 | 30 | 6 | 29 | 0 | 30 | 0 |
| 2/0 | 30 | 0 | 26 | 0 | 31 | 0 | 24 | 0 | 21 | 0 | 26 | 0 | 28 | 0 | 26 | 0 | 29 | 0 |
| 3/0 | 26 | 0 | 29 | 0 | 29 | 0 | 22 | 0 | 22 | 0 | 24 | 0 | 25 | 0 | 23 | 0 | 28 | 0 |
| 5/0 | 25 | 0 | 30 | 0 | 31 | 0 | 30 | 0 | 18 | 0 | 30 | 0 | 29 | 0 | 30 | 0 | 31 | 0 |
| 0/0 | 30 | 0 | 29 | 0 | 28 | 0 | 26 | 0 | 13 | 0 | 27 | 0 | 26 | 0 | 32 | 0 | 30 | 0 |
| 0,1/0,1 | 28 | 68 | 26 | 53 | 29 | 0 | 22 | 0 | 4 | 652 | 27 | 17 | 25 | 6 | 29 | 6 | 39 | 0 |
| 0,5/0,1 | 27 | 44 | 28 | 149 | 27 | 0 | 23 | 0 | 8 | 497 | 30 | 0 | 28 | 0 | 28 | 0 | 31 | 0 |
| 1/0,1 | 28 | 53 | 29 | 94 | 31 | 0 | 27 | 10 | 12 | 19 | 30 | 0 | 29 | 0 | 30 | 0 | 31 | 0 |
| 2/0,1 | 30 | 14 | 31 | 6 | 29 | 0 | 29 | 8 | 15 | 0 | 30 | 0 | 30 | 0 | 29 | 0 | 30 | 0 |
| 3/0,1 | 29 | 19 | 30 | 9 | 28 | 0 | 28 | 4 | 21 | 0 | 30 | 0 | 31 | 0 | 28 | 0 | 31 | 0 |
| 5/0,1 | 31 | 8 | 30 | 2 | 30 | 0 | 27 | 2 | 20 | 0 | 30 | 0 | 30 | 0 | 28 | 0 | 31 | 0 |

Tabela 4 – Médias de plantas regeneradas da variedade RB835089 após tratamento com BAP e ANA na luz, após cultivo em meio MS dos discos foliares em diferentes concentrações de 2,4-D no escuro

| | RB835089 – Pré-tratamento no escuro | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Tratamentos | 5 dias | | | 8 dias | | | 10 dias | | |
| BAP/ANA | 5 mg/L | 8 mg/L | 10 mg/L | 5 mg/L | 8 mg/L | 10 mg/L | 5 mg/L | 8 mg/L | 10 mg/L |
| | Plantas | Plantas | Plantas | Plantas | Plantas | Plantas | Plantas | Plantas | Plantas |
| 0/0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,1/0 | 11bB | 16bA | 2aC | 26aA | 13cB | 4aC | 2aB | 3aA | 0 |
| 0,5/0 | 4cB | 9cA | 3aC | 9bB | 12cA | 5aC | 7aA | 2bB | 0 |
| 0,1/0,1 | 17aA | 8cB | 0 | 0 | 23aA | 3bB | 0 | 3aA | 0 |
| 0,5/0,1 | 8bB | 37aA | 0 | 0 | 20bA | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1/0,1 | 13bB | 31aA | 0 | 2cA | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2/0,1 | 7bA | 6cA | 0 | 2cA | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3/0,1 | 6bA | 3dB | 0 | 1cA | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5/0,1 | 8bA | 1eB | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Médias, letras minúsculas (colunas) e letras maiúsculas (linhas) seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Tukey, $p<0,05$).

Tabela 5 – Total de discos foliares oxidados (DO) e de plantas regeneradas (PR) da variedade RB855156 de cana-de-açúcar após cultivo em meio MS em diferentes tratamentos com BAP e ANA na presença de luz, após pré-tratamento no escuro em diferentes concentrações de 2,4-D

| | RB855156 – Pré-tratamento 2,4-D | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 5 dias | | | | | | 8 dias | | | | | | 10 dias | | | | | |
| BAP/ANA | 5 mg/L | | 8 mg/L | | 10 mg/L | | 5 mg/L | | 8 mg/L | | 10 mg/L | | 5 mg/L | | 8 mg/L | | 10 mg/L | |
| | DO | PR | DO | PR | DO | PR | DO | PR | DO | PR | DO | PR | DO | PR | DO | PR | DO | PR |
| 0/0 | 32 | 0 | 32 | 0 | 32 | 0 | 32 | 0 | 32 | 0 | 32 | 0 | 32 | 0 | 32 | 0 | 32 | 0 |
| 0,1/0 | 13 | 48 | 16 | 119 | 14 | 43 | 14 | 152 | 16 | 328 | 13 | 143 | 23 | 33 | 22 | 89 | 18 | 57 |
| 0,5/0 | 18 | 41 | 15 | 146 | 23 | 34 | 16 | 178 | 12 | 417 | 8 | 230 | 26 | 06 | 16 | 98 | 11 | 98 |
| 1/0 | 18 | 43 | 18 | 124 | 11 | 86 | 17 | 189 | 18 | 82 | 16 | 89 | 30 | 24 | 19 | 22 | 13 | 53 |
| 2/0 | 17 | 0 | 14 | 0 | 22 | 0 | 21 | 8 | 15 | 3 | 25 | 0 | 28 | 0 | 18 | 0 | 16 | 0 |
| 3/0 | 21 | 0 | 17 | 0 | 15 | 0 | 17 | 0 | 13 | 0 | 16 | 0 | 25 | 0 | 20 | 0 | 19 | 0 |
| 5/0 | 18 | 0 | 13 | 0 | 27 | 0 | 19 | 0 | 22 | 0 | 18 | 0 | 29 | 0 | 28 | 0 | 18 | 0 |
| 0/0 | 19 | 0 | 23 | 0 | 18 | 0 | 25 | 0 | 15 | 0 | 25 | 0 | 26 | 0 | 23 | 0 | 17 | 0 |
| 0,1/0,1 | 19 | 44 | 19 | 112 | 15 | 22 | 15 | 157 | 9 | 532 | 12 | 166 | 25 | 69 | 14 | 86 | 19 | 69 |
| 0,5/0,1 | 16 | 70 | 18 | 167 | 14 | 35 | 13 | 192 | 14 | 397 | 11 | 157 | 28 | 10 | 12 | 64 | 21 | 72 |
| 1/0,1 | 19 | 59 | 13 | 74 | 19 | 0 | 18 | 169 | 17 | 203 | 19 | 71 | 29 | 16 | 19 | 24 | 14 | 52 |
| 2/0,1 | 15 | 3 | 24 | 0 | 24 | 0 | 21 | 0 | 18 | 0 | 23 | 0 | 30 | 0 | 10 | 0 | 26 | 0 |
| 3/0,1 | 23 | 0 | 18 | 0 | 21 | 0 | 25 | 0 | 25 | 0 | 21 | 0 | 31 | 0 | 17 | 0 | 21 | 0 |
| 5/0,1 | 18 | 0 | 21 | 0 | 29 | 0 | 23 | 0 | 28 | 0 | 19 | 0 | 30 | 0 | 16 | 0 | 25 | 0 |

Tabela 6 – Médias de plantas regeneradas da variedade RB855156 após tratamento com BAP e ANA na luz, após cultivo em meio MS dos discos foliares em diferentes concentrações de 2,4-D no escuro

| | RB855156 – Pré-tratamento no escuro | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Tratamentos | 5 dias | | | 8 dias | | | 10 dias | | |
| BAP/ANA | 5 mg/L | 8 mg/L | 10 mg/L | 5 mg/L | 8 mg/L | 10 mg/L | 5 mg/L | 8 mg/L | 10 mg/L |
| | Plantas | Plantas | Plantas | Plantas | Plantas | Plantas | Plantas | Plantas | Plantas |
| 0/0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,1/0 | 2cB | 7bA | 2cB | 8cB | 20bA | 7bB | 3cC | 8aA | 4bC |
| 0,5/0 | 2cB | 8bA | 3bB | 11bB | 20bA | 9aB | 1dC | 6bA | 4bB |
| 1/0 | 3bB | 8bA | 4aA | 12aA | 5dB | 5cB | 12aA | 1dB | 2cB |
| 0,1/0,1 | 3bB | 8bA | 3bB | 9cB | 23aA | 8aB | 9bA | 4cB | 5aB |
| 0,5/0,1 | 4aB | 12aA | 2cB | 10bB | 22aA | 7bC | 2dB | 3cB | 6aA |
| 1/0,1 | 4aA | 4cA | 0 | 12aA | 13cA | 5cB | 5cA | 1dB | 2cB |

Médias, letras minúsculas (colunas) e letras maiúsculas (linhas) seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Tukey, $p<0,05$).

Os resultados mostraram que 8 dias em ausência de luz é o período mais adequado para o cultivo dos discos foliares na presença de 8,0 mg/L de 2,4-D. A transferência desses discos foliares para baixas concentrações de BAP resultou na maior eficiência de regeneração de plantas, neste experimento. Nas duas variedades, foi possível observar a regeneração de pelo menos 1-2 plâtulas por explante, que atingiram aproximadamente 1 cm de altura em 45 dias nos tratamentos com maior número de plantas regeneradas. O número de plantas regeneradas variou para as duas variedades. Entretanto, ficou óbvio que o cultivo dos discos foliares durante 8 dias no escuro promoveu um aumento no número de plantas regeneradas nas concentrações mais baixas de BAP, como descrito por Franklin (2006). O aumento na concentração de BAP e NAA, acima de 1 mg/L não significa aumento no número de plantas regeneradas a partir dos discos foliares de cana-de-açúcar (LAKSHMANAN, 2006a). O cultivo em curto período em contato com 2,4-D e a utilização de tecidos jovens pode reduzir a frequência de variação somaclonal, que pode causar alterações de características originais do genoma da planta (TAWAR et al., 2008; RAJESWARI et al., 2009).

### 4.3 Pré-tratamento em meio contendo 2,4-D e cinetina (MS3K)

Nesse experimento objetivou-se determinar a capacidade de regeneração de plantas dos discos foliares de cana-de-açúcar das variedades RB835089, RB855156 e RB72454 cultivados durante 7, 14, 21 e 28 dias no escuro no meio MS3K, que contém 2,4-D (3 $mg.L^{-1}$) e cinetina (0,1 $mg.L^{-1}$). Após cada período, os discos foram transferidos para o meio de regeneração MS basal, portanto, sem reguladores de crescimento.

Após 7 dias no escuro, pouco tecido embriogênico estava formado nos discos. Nos tratamentos de 14, 21 e 28 dias observou-se a formação de calos embriogênicos em todas as lâminas foliares, podendo-se visualizar os embriões somáticos. O número de plantas regeneradas após o cultivo dos discos foliares em 7 dias foi significativamente mais baixo para a variedade RB855156. O número de plantas regeneradas após o cultivo dos discos foliares aumentou e foi significativo em 14, 21 e 28 dias para a variedade RB835089 e em 14 e 21 dias para a variedade RB855156, comparando-se com a regeneração da variedade RB72454 (Tabela 7). O cultivo dos discos foliares durante 21 dias no meio MS3K resultou no maior número de plantas regeneradas, com a média de 49,4 plantas RB835089 e 50,5 plantas RB855156 e 16,2 plantas RB72454 (Tabela 7). O número de discos foliares não oxidados foi alto, mas mesmo assim foi elevado o

número de plantas regeneradas, inclusive no tratamento de 21 dias. É interessante observar que o maior número de plantas regeneradas nem sempre foi obtido a partir dos discos foliares mais responsivos. Isto foi observado para a variedade RB855156, com média de 50,5 plantas por disco foliar e 80% dos discos não oxidados, e para a variedade RB72454 com 16,2 plantas por disco e 90% dos discos não oxidados (Tabela 7).

Tabela 7 – Plantas regeneradas de discos foliares das variedades RB835089, RB855156 e RB72454 cultivadas em diferentes períodos em meio MS3K no escuro transferidas para meio de regeneração na luz

| | RB835089 | | RB855156 | | RB72454 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Período em escuro | Explantes responsivos(%) | Plantas | Explantes responsivos(%) | Plantas | Explantes responsivos(%) | Plantas |
| 7 dias | 25% | 0,7 ± 0,63bB | 20% | 8,6 ± 7,9cA | 30% | 0,4 ± 0,39cB |
| 14 dias | 95% | 44,2 ± 10,4aA | 75% | 41,0 ± 26,5aA | 75% | 13,2 ± 4,29bB |
| 21 dias | 95% | 49,4 ± 10,73aA | 80% | 50,5 ± 27,1aA | 90% | 16,2 ± 5,9aB |
| 28 dias | 95% | 40,1 ± 5,7aA | 90% | 36,9 ± 22,2bB | 90% | 15,7 ± 3,55aC |

Média ± Desvio Padrão de regeneração de plantas para o Número de Dias de Cultivo no Escuro seguidos pela mesma letra minúscula (colunas) e de Característica de Calos embriogênicos seguidas pela mesma letra maiúscula (linhas) não diferem estatisticamente (Tukey ao nível de 5% de probabilidade); n = 20

Neste experimento pode-se observar um efeito de genótipo (variedade) para o número de plantas regeneradas a partir de discos de folhas imaturas. A partir de 10 dias em meio com 2,4-D, observou-se a formação dos primeiros tecidos de calos embriogênicos. Assim, de 14 a 21 dias, a regeneração ocorre a partir de embriogênese somática indireta, com formação de calos embriogênicos, mas sem a necessidade de realizar subcultivos onerosos e laboriosos (SNYMAN et al., 2000; 2001; GEIJSKES et al., 2003; DESAI et al., 2004; MULLEEGADOO; DOOKUN-SAUMTALLY, 2005; LAKSHMAN, 2006a). A escolha do método de cultura e as respostas genotípicas a um tratamento hormonal pode explicar as diferenças na eficiência de plantas regeneradas a partir de explantes de cana-de-açúcar (CIDADE, 2006; SNYMAN, 2006). Este método de produção de plantas a partir de discos de folhas oferece vantagens comparando-se aos métodos que envolvem a cultura de meristemas apicais ou gemas laterais com formação de calos (RAJESWARI et al., 2009; SNYMAN, 2006). A variedade RB72454 apresentou regeneração de plantas a partir discos foliares jovens nos três períodos de cultivo no escuro, sendo significativos os períodos de 21 dias, com a média de 16,2 plantas por disco, e 28 dias, com média de 15,7

plantas por disco. A variedade RB72454 mostrou-se recalcitrante para regenerar plantas a partir de calos embriogênicos, como também observado por Lima (2001). A utilização dos discos foliares pode tornar viável a regeneração de plantas a partir de genótipos recalcitrantes, permitindo que os reguladores de crescimento endógenos e exógenos estimulem a formação de calos e embriões somáticos (LAKSHMANAN, 2006a).

## 4.4. Transformação genética por biolística

### 4.4.1 Calos

Os 192 calos embriogênicos da variedade RB835486 bombardeados com os plasmídeos pHA9-neo e pAHC17-comt(AS) por cotransformação produziram o total de 66 plantas regeneradas em meio MS contendo geneticina (30 mg/L), como agente seletivo, na presença de luz. Cada planta regenerada foi considerada um evento de transformação quando se apresentavam individualizadas ou em um conjunto de poucas plantas formando pequenas touceiras. A reação de PCR em 42 plantas, utilizando os primers específicos do gene *neo*, amplificou o fragmento esperado de 410 pb em 22 plantas. Na Figura 8 está demonstrado em gel de agarose 1% o resultado da reação de PCR de 13 eventos independentes de transformação, onde somente as plantas 8 e 9 não são transgênicas para o gene *neo*. Nas análises dessas plantas por PCR, não foram obtidos resultados positivos com os primers específicos que amplificam um fragmento da construção pAHC17-comt(AS).

A eficiência de transformação de calos embriogênicos considerando-se apenas o gene *neo* foi de 52% (Tabela 8). A existência de plantas escapes no processo de seleção com geneticina é relatado por Arencibia et al. (1998) e Tulmann Neto, Ulian e Falco (2000) e Passarin (2009). O insucesso da transformação genética de calos para o gene *comt(as)* pode ter sido devido à metodologia de cotransformação, que depende da integração independente dos dois genes de interesse e ou pela não agregação do transgene às partículas de tungstênio (BOWER; BIRCH,

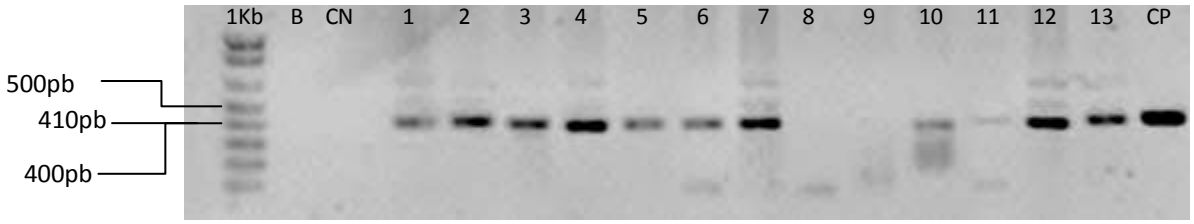


Figura 8 - Gel de agarose (1%) com o fragmento de 410 pb, amplificado por PCR e correspondente ao gene *neo*, em plantas regeneradas a partir de calos cultivados em meio seletivo (geneticina 30 mg/L) após o bombardeamento. CP = controle positivo; B = $ddH_2O$; CN = controle negativo; 1kb = 1kb DNA ladder plus (Invitrogen); 1 a 13 = plantas de eventos independentes de transformação provenientes de calos embriogênicos

1992; LAKSHMANAN et al., 2005; PASSARIN, 2009).

Os calos utilizados neste método de transformação foram os de morfologia embriogênica em estádio de desenvolvimento inicial o que reduziria a possibilidade de variação somaclonal, como relatado por Arencibia et al. (1998), citado por Passarin (2009). Apesar desta abordagem a produção de transgênicos varia bastante, entre 0,1 e 2,9-20 plantas por bombardeamento de calos embriogênicos (SNYMAN, 2006; GALLO-MEAGHER; IRVINE, 1996; BOWER et al., 1996).

Tabela 8 – Resultados de cotransformação via biolística da variedade RB835456 e regeneração de plantas em meio seletivo (geneticina 30 mg/L) e confirmadas como transgênicas por amplificação via PCR

| Biolística dos explantes | Número de placas bombardeadas | Número de explantes por placa | Plantas regeneradas em meio seletivo | Número de plantas analisadas | Plantas PCR (+) gene *neo* | Eficiência *neo* (%) | Plantas PCR (+) gene *comt*(AS) | Eficiência *comt*(AS) (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Calos | 6 | 32 | 66 | 42 | 22 | 52 | 0 | 0 |
| Disco foliar (MS8) | 6 | 15 | 73 | 58 | 33 | 57 | 4 | 7 |
| Disco Foliar (MS3K) | 6 | 15 | 86 | 40 | 36 | 90 | 14 | 38 |
| Total | 18 | | 225 | 120 | 91 | 75 | 18 | 19 |

### 4.4.2 Discos foliares cultivados em meio de cultura MS8

Os 90 discos foliares da variedade RB835486 de cana-de-açúcar cultivados durante 8 dias no escuro em meio MS8 foram bombardeados e produziram o total de 73 plantas em meio de regeneração MS contendo 0,1 mg/L de BAP e 30 mg/L de geneticina (meio seletivo), na presença de luz (Tabela 8). A reação de PCR de 58 plantas, resultantes de eventos independentes de transformação, com os primers específicos para o gene *neo* amplificou o fragmento esperado de 410 pb em 33 plantas (Figura 9). Destas 33 plantas, 4 plantas também tiveram o fragmento de 313 pb amplificado por PCR, fragmento este referente à construção pAHC17-comt(AS) (Tabela 8). Na Figura 9, estão apresentados os resultados de eletroforese da reação de PCR de 34 eventos de transformação, mostrando as amplificações do gene *neo* em 22 plantas (1, 2, 4, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 23, 24, 25, 26, 27, 30, 31 e 32). Como mostrado na Tabela 8, a eficiência de transformação para o gene *neo* nas plantas analisadas foi de 57 %, enquanto que para o gene da comt(AS) foi de 7% das plantas analisadas ou de 12 % a partir das plantas com o gene *neo*.

Neste método utilizando discos de folhas imaturas, a vantagem da regeneração direta para transformação seria a redução do tempo de regeneração das plantas candidatas a serem transgênicas (ELLIOT, 2002; FRANKLIN, 2006), pois em 4-6 semanas já é possível realizar a primeira análise de confirmação para transgenia (Figura 12). Franklin (2006) relata que em experimentos preliminares de transformação por biolística com expressão transitória do gene GUS, não foi observada a expressão de gene após o bombardeamento, nas regiões cortadas dos segmentos da nervura que foram alvejadas. Entretanto, na superfície dorsal e ventral da nervura alvejada, um foco da expressão transiente GUS foi visto, indicando que a produção de compostos fenólicos nas regiões cortadas também interfere com o processo de transformação. Em concordância com este resultado, neste experimento o momento oportuno de bombardeio dos discos foliares da variedade RB835486 ocorreu no 8º dia de cultivo quando os embriões somáticos estavam formados, seguida pela transferência para meio de regeneração com BAP e ANA, na presença de luz.

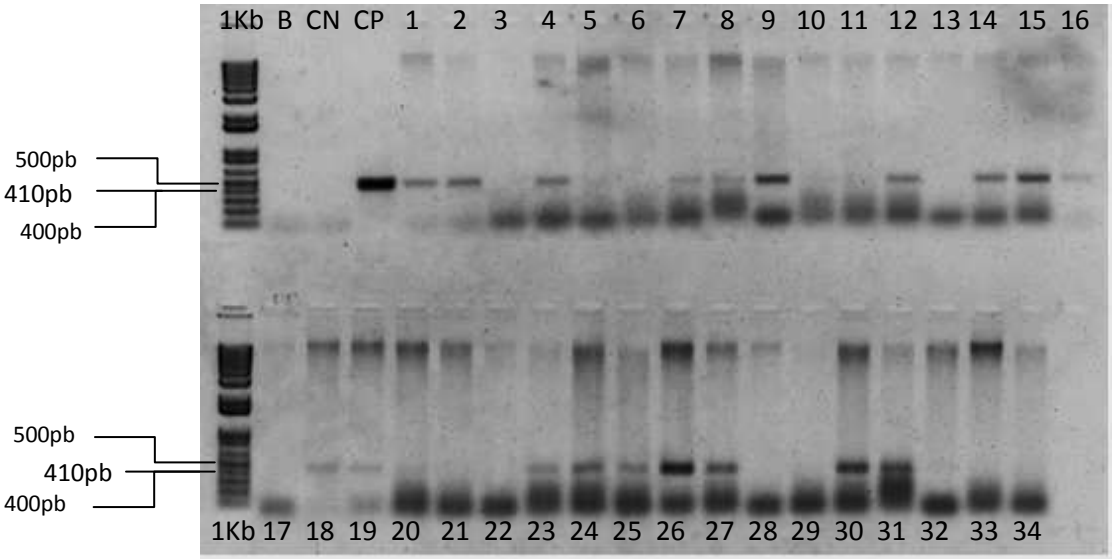


Figura 9 - Gel de agarose (1%) mostrando a amplificação do fragmento de 410 pb correspondente ao gene *neo* em plantas regeneradas a partir de calos cultivados em meio seletivo (geneticina 30 mg/L) após o bombardeamento. CP = controle positivo; B = $ddH_2O$; CN = controle negativo; 1kb = 1kb DNA ladder plus (Invitrogen); 1 a 34 = plantas de eventos independentes de transformação provenientes de discos foliares crescendo em meio MS8

### 4.4.3 Discos foliares cultivados em meio de cultura MS3K

Os 90 discos foliares de cana-de-açúcar da variedade RB835486 cultivados durante 15 dias no escuro, em meio MS3K foram bombardeados e produziram 86 plantas em meio MS com 0,1 mg/L de BAP e 30 mg/L de geneticina (meio seletivo), na presença de luz. A análise de PCR de 40 plantas com os primers específicos do gene *neo* amplificou o fragmento esperado de 410 pb em 36 plantas. Na Figura 10 está apresentado o resultado de amplificação de 13 amostras de eventos independentes de transformação, sendo visível o fragmento de 412 pb em todas as amostras, exceto nas plantas 6 e 9. Das 36 plantas analisadas, 14 apresentaram amplificação do fragmento de 313 pb definidos pelos primers específicos do plasmídeo pAHC17-comt(AS). A eficiência de transformação considerando-se o gene *neo* foi de 90 % e para o gene da *COMT*(AS) foi de 35% das plantas analisadas e 38% das plantas contendo o gene *neo*.

A Figura 11 mostra o resultado da eletroforese em gel de agarose 1% com a amplificação do fragmento esperado de 313 pb correspondente ao fragmento do plasmídeo pAHC17-comt(AS) de 10 amostras de plantas. Foi possível observar que as plantas 1, 4, 7 e 9 amplificaram o fragmento esperado, mas devido ao fato de que nas amostras 7 e 9 as bandas estão muito fracas, o produto de PCR foi sequenciado.

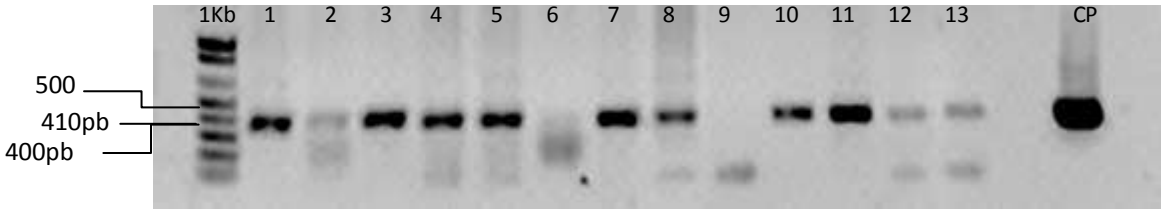


Figura 10 - Gel agarose (1%) mostrando a amplificação do fragmento de 410pb correspondente ao gene *neo* em plantas regeneradas a partir de discos foliares cultivados em meio seletivo (geneticina 30 mg/L) após o bombardeamento. CP = controle positivo; 1kb = 1kb DNA ladder plus (Invitrogen); 1 a 13 = plantas de eventos independentes de transformação de discos foliares provenientes do meio MS3K

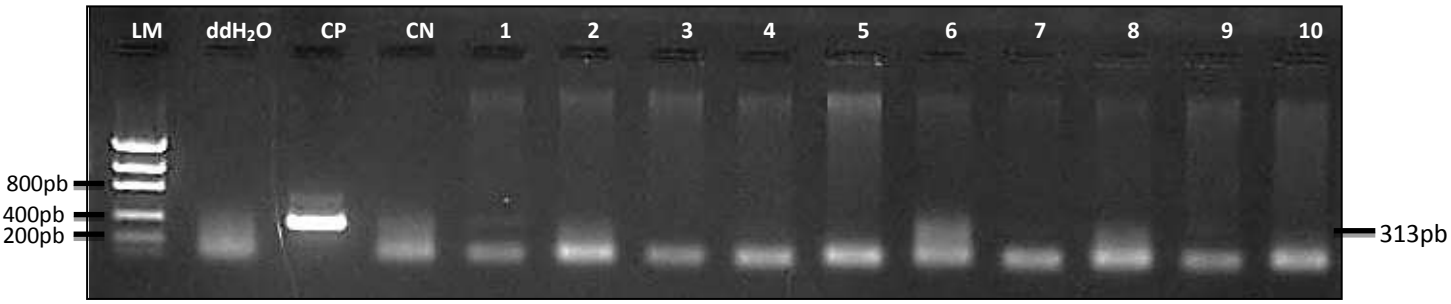


Figura 11 - Gel de agarose (1%) mostrando a amplificação do fragmento de 313pb correspondente ao pAHC17-*comt(AS)* em plantas regeneradas a partir de discos foliares cultivados em meio seletivo (geneticina 30 mg/L) após o bombardeamento. LM 100 pb= Low Mass (Invitrogen); $ddH_2O$ = $H_2O$, destilada e deionizada; CP = controle positivo; CN = controle negativo: 1 a 10= plantas de eventos independentes de transformação de discos foliares provenientes do meio MS3K

O bombardeamento de discos foliares seguido da regeneração direta, sem subcultivo de calos, pela rota da embriogênese somática direta (sem formação de calos) e indireta (com formação de calos) são abordagens que reduzem o tempo de cultivo e de bombardeamento dos tecidos alvo (SNYMAN et al., 2000; 2001; GEIJSKES et al., 2003; DESAI et al., 2004; MULLEEGADOO; DOOKUN-SAUMTALLY, 2005). A regeneração de plantas transgênicas em discos foliares de cana-de-açúcar também teve seu tempo reduzido ao contrário do que ocorreu com os calos embriogênicos como tecidos alvo do processo de bombardeamento e de cultura de tecidos (BIRCH 1997; ELLIOT, 2002; FRANKLIN, 2006; SNYMAN et al., 2000; 2006; LAKSHMANAN, 2006a). Esta abordagem de cultura de discos foliares de cana-de-açúcar demonstrou ser viável no processo de biolística para produzir cana-de-açúcar transgênica. A obtenção da cana-de-açúcar transgênica a partir dos discos foliares reduziu o tempo e tornou o processo como um todo menos oneroso e laborioso. A obtenção de plantas transgênicas neste experimento de regeneração direta via embriões somáticos, que ocorreu entre 6-8 semanas, foi menor quando comparado ao período de 14-22 semanas apresentado por Snyman et al. (2006). Neste experimento o bombardeamento ocorreu duas semanas após o cultivo em MS3K no escuro para serem em seguida transferidos para meio seletivo na luz, diferentemente do realizado por Snyman et al. (2006) que bombardeou os discos foliares antes do início do cultivo, para selecioná-los em meio seletivo no escuro. Em 6-8 semanas após o bombardeamento neste experimento plantas de 1 cm regeneradas dos discos foliares em meio seletivo na presença de luz puderam ser observadas, contrastando com o tempo de 10-14 semanas relatado por Snyman (2000) (Figura 12).

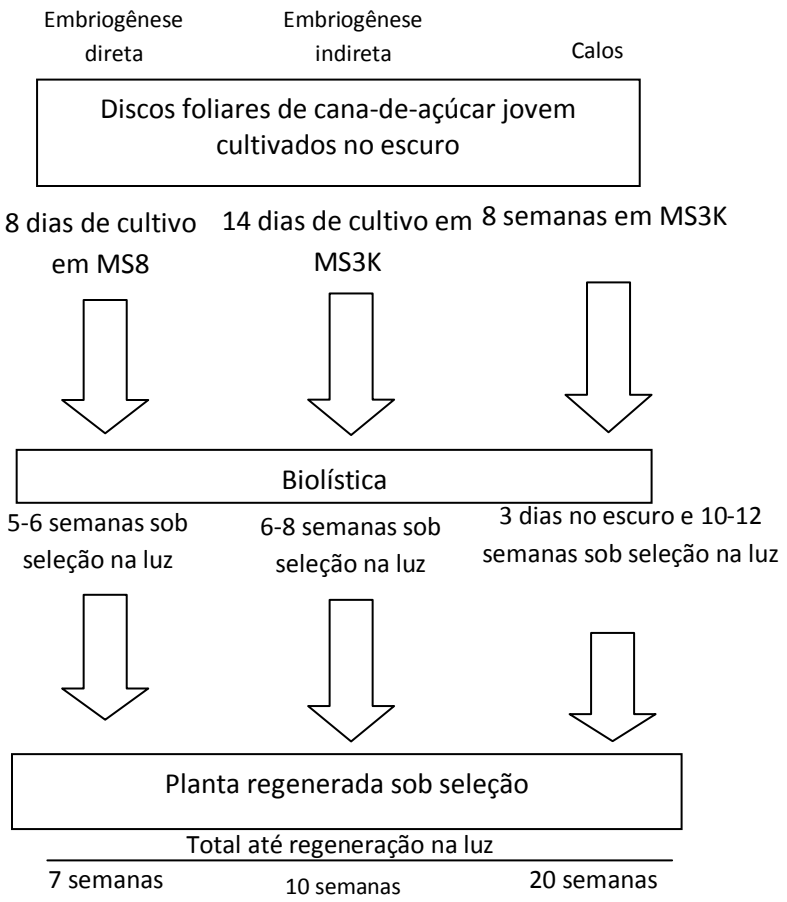


Figura 12 - Tempo relativo para produzir plantas transgênicas de cana-de-açúcar em culturas de diferentes estágios morfogênicos, pela via direta a partir de discos de folhas e a partir de calos embriogênicos

### 4.4.4 Sequenciamento de DNA

O fragmento de DNA amplificado por PCR nas plantas 7 e 9 (Figura 11) foi sequenciado utilizando o primer 5' CTC GGT CAT CAT CAC CAA GAA GCT CCT CGA GTT 3'. As sequências de DNA obtidas foram analisadas pela ferramenta Blast (Basic Local Alignment Search Tool) /NCBI (ALTSCHUL et al., 1990) (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), que demonstrou similaridade com outras sequências da proteína do ácido 3-O-methyltransferase disponíveis no GenBank (Figura 13), o que confirma a inserção do gene da COMT(AS) no genoma destas plantas.

```
>lcl|26619 gi|34398679|gb|AY365419.1|acid_3-O-methyltransferase(COMT)
Length=2012
```

Amostra 7

```
                                                        Sort alignments for this subject sequence by:
                                                          E value  Score  Percent identity
                                                          Query start position  Subject start position

 Score =  381 bits (422),  Expect = 2e-109
 Identities = 249/263 (94%), Gaps = 9/263 (3%)
 Strand=Plus/Minus

Query  75    GGCTCCACTTCATGTCGGCTGGCGTCGCCCGCCGGCACCGACTTGTAACATGTCCCCGCC  134
             || ||||||||||||  || ||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||
Sbjct  1722  GGATCCACTTCATGA-GGATGGCGTCGCCCGCCGGCACCGACTTG-AACATGTCCCCGCC  1665

Query  135   GTACGTGCTGCACGCCGGGGTNACGGCGGCGCCTCGGTAGTNTCACGTGGGGGAGGTCGA  194
             | ||||||||||||||||||  |||||||||||||||| ||  ||||||||||||||||||
Sbjct  1664  G-ACGTGCTGCACGCCGGGG-AACGGCGGCGCCTCGG-AG-ATCACGTGGGGGAGGTCGA  1609

Query  195   AGTTGATGCCCTTGTATCTGCGGGTGGTGCGAGGTGATGGCGTGCAGGGTGGCGCCGATG  254
             |||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1608  AGTTGATGCCCTTG-ATCTGCGGGTGGTGCGAGGTGATGGCGTGCAGGGTGGCGCCGATG  1550

Query  255   CCGCCGCCCACGTCGACGAGCGTGGAGACGCCCTCGAAGCCCGTGTAGAACTCGAGGAGC  314
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1549  CCGCCGCCCACGTCGACGAGCGTGGAGACGCCCTCGAAGCCCGTGTAGAACTCGAGGAGC  1490

Query  315   TTCTTGNGTGATGATGAACCGAG  337
             |||||| ||||||||| ||||||
Sbjct  1489  TTCTTG-GTGATGATG-ACCGAG  1469


 Score = 22.9 bits (24),  Expect = 0.18
 Identities = 12/12 (100%), Gaps = 0/12 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  39    TTGTTTGGTGTT  50
             ||||||||||||
Sbjct  993   TTGTTTGGTGTT  1004
```

```
>lcl|54213 gi|34398679|gb|AY365419.1|acid_3-O-methyltransferase(COMT)
Length=2012
```

Amostra 9

```
                                                        Sort alignments for this subject sequence by:
                                                          E value  Score  Percent identity
                                                          Query start position  Subject start position

 Score =  392 bits (434),  Expect = 9e-113
 Identities = 224/226 (99%), Gaps = 2/226 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  6     TCTACACGGGCTTCGAGGGCGTCTCCACGCTCGTCGACGTGGGCGGCGGCATCGGCGCCA  65
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1501  TCTACACGGGCTTCGAGGGCGTCTCCACGCTCGTCGACGTGGGCGGCGGCATCGGCGCCA  1560

Query  66    CCCTGNCACGCCATCACCTCGCACCACCCGCAGATCAAGGGCATCAACTTCGACCTCCCC  125
             ||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1561  CCCTG-CACGCCATCACCTCGCACCACCCGCAGATCAAGGGCATCAACTTCGACCTCCCC  1619

Query  126   CACGTGATCTCCGTAGGCGCCGCCGTTCCCCGGCGTGCAGCACGTCGGCGGGGACATGTT  185
             ||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1620  CACGTGATCTCCG-AGGCGCCGCCGTTCCCCGGCGTGCAGCACGTCGGCGGGGACATGTT  1678

Query  186   CAAGTCGGTGCCGGCGGGCGACGCCATCCTCATGAAGTGGATCCTC  231
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1679  CAAGTCGGTGCCGGCGGGCGACGCCATCCTCATGAAGTGGATCCTC  1724


 Score = 22.9 bits (24),  Expect = 0.18
 Identities = 12/12 (100%), Gaps = 0/12 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query  252   AACACCAAACAA  263
             ||||||||||||
Sbjct  1004  AACACCAAACAA  993
```

Figura 13 - Análise de similaridade (Blast) da sequência de nucleotídeos dos produtos de PCR de duas plantas da variedade RB835486 (amostras 7 e 9 da Figura 11)

# 5 CONCLUSÕES

- A maior eficiência de regeneração de plantas de cana-de-açúcar provenientes de calos foi a partir de calos embriogênicos do tipo friável e compacto branco cultivados em até 60 dias no escuro;

- A melhor resposta de regeneração de plantas de cana-de-açúcar das variedades RB835089 e RB855156 pela embriogênese somática direta em discos de folhas foi para as concentrações inferiores a 1,0 mg/L de BAP após o cultivo dos discos de folhas imaturas em meio MS8 no escuro.

- Calos embriogênicos e folhas imaturas são tecidos alvo viáveis para o processo de transformação genética por biolística.

- A variedade RB835486 é viável ao processo de transformação

- Cotransformação genética com os genes *neo* e *comt(AS)* produziu plantas transgênicas obtidas a partir de discos de folhas imaturas.

- A regeneração de plantas de cana-de-açúcar transformadas provenientes dos discos de folhas apresentaram maior eficiência de transformação e menor tempo de regeneração em 7-10 semanas quando comparadas com a resposta de plantas de cana-de-açúcar transformadas e regeneradas de calos embriogênicos cultivados.

## REFERÊNCIAS

AHLOOWALIA, B. S.; MARETZKI, A. P. Regeneration via somatic embryogenesis in sugarcane. **Plant Cell Reports.** Berlin, v. 2, p. 21-25, 1983.

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.

AMASINO, R. 1955: Kinetin arrives. The 50th anniversary of a new plant hormone. **Plant Physiology,** Minneapolis, v. 138, p. 1177–1184, 2005.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 01 fev. 2010.

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

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

CALDAS, L.S., HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998. v. 1, p. 87-132.

CASA GRANDE, A.A.; VASCONCELOS, A.C.M. de. Fisiologia da parte aérea. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; ANDRADE LANDELL, M.G. de; VASCONCELOS, A.C.M. de (Ed.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agronômico, 2008. p. 57.

CHENGALRAYAN, K.; ABOUZID, A.; GALLO-MEAGHER, M. In vitro regeneration from sugarcane seed-derived callus. **In Vitro, Cellular and Developmental Biology of Plant,** Gaithersburg, v. 41, n. 4, p. 477-282, 2005.

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.

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.

CIDADE, A.P.; GARCIA, R.O.; DUARTE, A.C.; SACHETTO-MARTINS, G.; MANSUR, E. Morfogênese in vitro das variedades brasileiras de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileria,** Brasília, v. 41, n. 3, p. 385-391, 2006.

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

DESAI, N.S.; JOSEPH, D.; SUPRASANNA, P.; BAPAT, V.A. Study of elemental variations during somatic embryogenesis in sugarcane using photon induced X-ray probe. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research.** Amsterdam, v. 252, p. 299-302, 2006.

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

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.

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.

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 *Diatrea saccharalis*. **Plant Physiology and Biochemistry.** Amsterdam, v. 41, p. 761-766, 2003.

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

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

FITCH, M.M.M.; DE LA CRUZ, A.; MOORE, P.H. Effectives of different selection markers for sugarcane transformation. In: PLANT GENOME CONFERENCE, 1995, San Diego. **Plant genome II**. Betsville: Biblioteca Nacional de Agricultura, 1995. p. 57.

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

FLUMINHAN, A.; DE AGUIAR-PERECIN, M.L.R. Embryogenic response and mitotic instability in callus cultures derived from maize inbred lines differing in heterochromatic knob content of chromosomes. **Annals of Botany.** Oxford, v. 82, p. 569-576, 1998.

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**, Heynh, v. 50, p. 111-119, 2006.

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.

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.

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.

GEIJSKES, R.J.; WANG, L.F.; LAKSHMANAN, P.; MCKEON, M.G.; BERDING, N.; SWAIN, R.S.; ELLIOTT, A.R.; GROF, C.P.L.; JACKSON, J.; SMITH, G.R. Smartsette seedlings: tissue culture seed plants for the Australian sugar industry. **Sugarcane International**. p. 13–17, May/June 2003.

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

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

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.

KAUR, A.; GOSAL, S.S. Desiccation of callus enhances somatic embryogenesis and subsequent shoot regeneration in sugarcane. **Indian Journal of Biotechnology,** New Delhi, v. 8, p. 332-334, 2009.

KHAN, I.A.; KHATRI, A. Plant regeneration via organogenesis or somatic embryogenesis in sugarcane: histological studies. **Pakistan Journal Botany.** Karachi, v. 38, n. 3, p. 631-636, 2006.

KHAN, I. A.; DAHOT, M.U.; SEEMA, N.; YASMEEN, S.; BIBI, S.; RAZA, G.; KHATRI, A.; NAQVI, M.H. Direct regeneration of sugarcane plantlets: a tool to unravel genetic heterogeneity. **Pakistan Journal Botany**, Karachi, v. 41, n. 2, p. 797-814, 2009.

KHAN, I.A.; KHATRI, A.; NIZAMANI, G.S.; SIDDIQUI, M. A.;KHANZADA, M.H.; DAHAR, N.A.; SEEMA, N.; NAQVI, M.H. In vitro studies in sugarcane **Pakistan Journal Biotechnology**, Karachi, v. 1, p 6-10, 2004.

LAKSHMAN, P. Invited rewiew addendum: Somatic embryogenesis in sugarcane. ***In Vitro* Cell Developmental Biology. Plant,** Gaithersburg, v. 42, p. 201–205, 2006b.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R.J.; .AITKEN, K.; GROF, C.L.P; BONNETT, G.D.; SMITH, G.R. Invited review: Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. ***In Vitro* Cell Developmental Biology. Plant,** Gaithersburg, v. 41, p. 345–363, 2005.

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

LAL, N High frequency plant regeneration from sugarcane callus. **Sugar Technology.** Amsterdam, v. 5, n. 1/2, p. 89-91, 2003.

LARKIN, P.J. Sugarcane tissue and protoplast culture. **Plant Cell and Organ Culture**, Gaithersburg, v. 1, p. 149-164, 1982.

LIMA, M.A.C.; GARCIA, R.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.

MULLEEGADOO, K.D.; DOOKUN-SAUMTALLY A. Genetic transformation of sugarcane by microprojectile bombardment of young leaf rolls. In: INTERNATIONAL SOCIETY SUGAR CANE TECHNOLOGISTS CONGRESS, 25., 2005. **Proceedings…** p. 579–583.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 15, p. 473–497, 1962.

NADAR, H.M., SOEPRAPTOPO, S.; HEINZ, J.; LADD, S.L. Fine structure of Sugarcane (*Saccharum* sp.) callus and the role of auxin in embryogenesis. **Crop Science**, Madison, v. 19, p. 210-216, 1978.

NAZ, S. Micropropagation of promising varieties of sugarcane and their acclimatization response. Activities on sugar crops in Pakistan. In: WORKSHOP RESEARCH, 4., 2003. **Proceedings…** p. 1-9.

NICKELL, L.G. Tissue and cell cultures of sugarcane: another research tool. **Hawaii Plant Records,** Honolulu, v. 57, p. 223–229, 1964.

PAPINI-TERZI, F.S.; ROCHA F. R.; VÊNCIO R. Z. N.; FELIX, J.M.; BRANCO, D. S.; WACLAWOVSKY, A. J.; LEMBKE, C. G.; COSTA, M. D. L.; NISHYAMAM, M. Y. Jr.; VIVENTINI, R.; VIVENTZ, M. G. A.; ULIAN E. C.;MENOSSI, M.; SOUZA, G. M. Sugarcane genes with sucrose content. **BioMed Central Gnomics.** London, p. 10-120, 2009

PASSARIN, D.M.M. **Transformação genética de cana-de-açúcar por biolística e *Agrobacterim 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.

PIQUEMAL, J.; CHAMAYOU, S.; NADAUD, I; BECKERT, M.; BARRIÈRE, Y.; MILA, I.;LAPIERRE, C.; RIGAU, J.; PUIGDOMENECH, P.; JAUNEAU, A.; DIGONNET, C.; BOUDET, A. M.; GOFFNER, D.; PICHON, M. Dow regulation of caffeic acid O-methyltransferase in maize revisited using a transgenic approach. **Plant Physiology.** Mondonville, v. 30, p. 1675-1685, 2002.

PRIOLI, L. M.; SÖNDAHL, M. R. Plant regeneration and recovery of fertile plants from protoplasts of maize (Z*ea mays* L.). **Nature Biotechnology,** London, v. 7, p. 589-594, 1989.

RAJESWARI, S.; THIRUGNANAKUMAR, S.; ANANDAN, A.; KRISHNAMURTHI, M. Somaclonal variation in sugarcane through tissue culture and evaluation for quantitative and quality traits. **Euphytica,** Wageningen, v. 168, p. 71–80, 2009.

RAMOS, R. L. B.; TOVAR, F. J.; JUNQUEIRA, R. M.; LINO, F. B.; SACHETTO-MARTINS, G. Sugarcane expressed sequences tags (ESTs) encoding enzymes involved in lignin biosynthesis pathways. **Genetics and Molecular Biology.** Ribeirão Preto, v. 24, p. 235-241, 2001.

RODRÍGUEZ, S.; MONDÉJAR, C.; RAMOS, M. E.; DÍAZ, E.; MARIBONA, O. A. Sugarcane somatic embryogenesis: a scanning electron microscopy study. **Tissue & Cell,** Essex, v. 28, n. 2, p. 149-154, 1995.

SCARPARI, M.S.; BEAUCLAIR, E.G. Fisiologia da parte aérea. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; ANDRADE LANDELL, M.G. de; VASCONCELOS, A.C.M. de (Ed.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agronômico, 2008. cap. 2, p. 47-56.

SILVA, F.A.S. E.; AZEVEDO, C.A.V. de. Principal components analysis in the software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN GRICULTURE, 7., 2009, Reno. Reno: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SNYMAN, S.J.; WATT, M.P.; HUCKETT, B.I.; BOTHA, F.C. Direct somatic embryogenesis for rapid, cost effective production of transgenic sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids). **Proceedings South African Sugar Technology,** Amsterdam, v. 74, p. 186–187, 2000.

SNYMAN, S. J.; HUCKETT B. I.; BOTHA F. C.; WATT MP (2001) A comparison between direct and indirect somatic morphogenesis for the production of transgenic sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids). **Acta Horticutulrae.** USA, v. 560, p. 105–108, 2001

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.

SOUZA, K.C.A; ABREU, H.S. Biotecnologia aplicada estudo da lignificação. **Floresta e Ambiente.** Rio de Janeiro, v. 14, n. 1, p. 93-109, 2007.

STEINMACHER, D.A.; KROHN, N.G.; DANTAS, A.C.M.; STEFENON, V.M.; CLEMENT, C.R.; GUERRA, M.P. Somatic embryogenesis in peach palm using the thin cell layer technique: induction, morpho-histological aspects and AFLP analysis of somaclonal variation. **Annals of Botany,** Oxford, v. 100, p. 699–709, 2007.

SUPRASSANA, P.; CHOUDHARY, R. S.; DESAI, N. S.; BAPAT, V. A. Regulation of somatic embryogenesis by plant growth regulators in sugarcane. **Sugar Technology.** Amsterdam, v. 7, n. 4, p. 123-128, 2005.

TAWAR, P.N.; SAWANT, R.A., DALVI, S.G.; NIKAM, A.A.; KAWAR, P.G.; DEVARUMATH, R.M. An assessment of somaclonal variation in micropropagated plants of sugarcane by RAPD markers. **Sugar Technology**, Amsterdam, v. 10, n. 2, p. 124-127, 2008.

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

VAIN, P.; McMULLEN, M.D.; FINER, J.J. Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. **Plant Cell Reports,** Berlin, v. 12, p. 84–88, 1993.

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, p. 39-43, 2008.

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.

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.

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.

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,** Beijing, v. 48, p. 453-459, 2006.