UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

Tese de Mestrado

**Cultura de células em suspensão como ferramenta para
estudos em parede celular secundária em gramíneas C4**

Marcella Siqueira Simões

Orientador: Profº Dr. Igor Cesarino

São Paulo. Novembro de 2017.

Marcella Siqueira Simões

Cultura de células em suspensão como ferramenta para estudos em parede celular secundária em gramíneas C4

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em ciências, na Área de Biologia de Sistemas

São Paulo. Novembro de 2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Simões, Marcella Siqueira

Cultura de células em suspensão como ferramenta para estudos em parede celular secundária em gramíneas C4 / Marcella Siqueira Simões; orientador Igor Cesarino. -- São Paulo, 2017.

144 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica.

1. Gramíneas C4. 2. Cultura de tecidos. 3. Parede celular secundária. 4. Lignina. 5. Xilogênese. I. Cesarino, Igor, orient. II. Título.

Catalogação da Publicação
Serviço de Biblioteca do Instituto de Biociências

MARCELLA SIQUEIRA SIMÕES

Cultura de células em suspensão como ferramenta para estudos em
parede celular secundária em gramíneas C4

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de
Mestre em ciências, na Área de
Biologia de Sistemas

Banca examinadora:

Membros titulares

Prof^o Dr: Igor Cesarino (Orientador e Presidente) - Instituto de Biociências/
USP

Assinatura: _____

Prof^a Dr^a: Helaine Carrer – ESALQ/ USP

Assinatura: _____

Prof^o Dr: Wagner C. Otoni – Universidade Federal de Viçosa

Assinatura: _____

Membros Suplentes

Prof^a Dr^a: Eny lochevet Segal Floh - Instituto de Biociências/ USP

Assinatura: _____

Prof^a Dr^a: Adriana Pinheiro Martinelli - Cena/ USP

Assinatura: _____

Prof^a Dr^a: Sara Ádrian Lopez de Andrade - UNICAMP

Assinatura: _____

Aos meus pais, meus exemplos de determinação, força de vontade e coragem, e ao meu esposo por ser lugar de refúgio e sempre me apoiar,

DEDICO.

A todos que participaram da minha caminhada e contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional, e em especial ao meu orientador pela paciência e dedicação,

AGRADEÇO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar, pelas minhas conquistas, me fortalecendo nas adversidades e dificuldades, e renovando minhas forças a cada dia.

Aos meus pais Márcia e José Helio, responsáveis pela formação do meu caráter e projeções profissionais, e por todo sacrifício que fizeram em prol dos meus estudos.

Ao meu esposo Felipe M. Araújo, por estar sempre ao meu lado, me incentivando a crescer, principalmente me motivando nos momentos difíceis e por ser meu porto seguro. Por acreditar que eu era capaz e por se alegrar a cada nova conquista, a cada experimento. Por se preocupar com o andamento do meu trabalho, ainda que muitas vezes não entendesse os processos por trás dos experimentos montados, sempre se prontificando a me ajudar e acreditando que uma hora os resultados sairiam.

Ao meu Orientador, Prof^o Dr. Igor Cesarino, pela orientação, pelas oportunidades concedidas, por todo o conhecimento e principalmente pela confiança depositada na realização do meu trabalho. Agradeço grandemente esse tempo de aprendizado que passei ao seu lado, por tudo que aprendi contigo, pela paciência, dedicação, carinho e em especial pelos trabalhos de chinesa grávida. Tenho grande admiração pelo profissional que você é.

Aos amigos que conquistei, aos momentos de descontração e risada que tornaram essa caminhada muito mais leve e divertida. Em especial aos meus amigos, Giovanni Victório Cerruti, Bruno Viana Navarro, Amanda Macedo e Leandro Oliveira, os quais espero levar para o resto da vida.

Ao grupo de pesquisa Lignin Lab, coordenado pelo meu orientador Prof^a Dr Igor Cesarino e composto pelos colegas de pesquisa Raphael Svartman, Gabriel Garon Carvalho. Em especial ao Pos Doc Sávio Siqueira Ferreira, pela dedicação, paciência e carinho com o qual me auxiliou e ajudou durante a realização do meu trabalho.

A Prof^a Dr^a Eny lochevet Segal Floh, responsável pelo laboratório de BioCel - USP, pelo acolhimento e carinho com o grupo de pesquisa o qual me encontro, pela concessão do espaço e equipamentos cedidos para a realização e execução do presente trabalho.

A FAPESP, pela concessão da bolsa de mestrado (processo 2015/18361-5) e pelo fomento do projeto JP (processo 2015/02527-1) do Prof^o Dr Igor Cesarino, no qual meu projeto de mestrado está inserido.

ÍNDICE

RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Parede celular	14
1.2 Bioenergia	18
1.3 Gramíneas.....	22
1.4 Cultura de tecidos.....	24
2. OBJETIVOS	30
3 CAPÍTULO 1 – Sorghum bicolor – Estabelecimento de cultura de tecidos em sorgo a partir de diferentes tipos de explantes e utilizando diferentes meios de indução.....	31
3.1 INTRODUÇÃO	31
3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
3.2.1 Indução de calos de sorgo a partir do epicótilo	36
3.2.2 Indução de calos de sorgo a partir de embriões imaturos	40
3.2.3 Análise histológica dos calos de sorgo	43
3.2.4 Indução de calos de sorgo a partir de embriões imaturos e raízes utilizando diferentes concentrações de auxina e cinetina	44
3.2.5 Indução de calos de sorgo a partir do palmito.....	50
3.2.6 Indução de calos de sorgo a partir de inflorescência imatura.....	52
3.2.7 Estabelecimento de células em suspensão em sorgo.....	54
3.3 CONCLUSÃO GERAL.....	55
3.4 Material e Métodos	59
3.4.1 Material vegetal e condições de cultivo	59
3.4.2 Indução de calos de sorgo a partir do epicótilo	59
3.4.3 Indução de calos de sorgo a partir de embriões imaturos	60
3.4.4 Indução de calos de sorgo sob diferentes concentrações e razões hormonais, utilizando embriões imaturos e raiz cultivada in vitro	60
3.4.5 Indução de calos de sorgo a partir de palmito.....	60
3.4.6 Indução de calos de sorgo a partir de inflorescência imatura.....	61
3.4.7 Células em suspensão de sorgo.....	61
3.4.8 Análise histológica dos calos obtidos.....	62
4 CAPÍTULO 2 – Estabelecimento de calos friáveis e cultura de células em suspensão em Setaria viridis.....	63
4.1 INTRODUÇÃO.....	63
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.2.1 Indução de calos e estabelecimento de cultura de células em suspensão em Setaria viridis	66
4.2.2 Testes de indução de transdiferenciação de elementos traqueais nas culturas de suspensão de S. viridis, com base no protocolo estabelecido para bambu (Ogita et al., 2012)	69
4.2.3 Testes de indução de transdiferenciação de elementos traqueais nas culturas de suspensão de S. viridis, com base no protocolo estabelecido para switchgrass (Shen et al., 2013) e combinação com a citocinina tidiazuron (TDZ)	71
4.2.4 Utilização de diferentes concentrações e combinações hormonais na indução de elementos traqueais	72
4.2.5 Testes de indução de transdiferenciação de elementos traqueais nas culturas de suspensão de S. viridis, utilizando diferentes compostos que induzem a formação de xilema em eudicotiledôneas	74
4.3 CONCLUSÃO GERAL	79

4.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	82
4.4.1 Indução de calos de <i>S. viridis</i> a partir de embriões maduros	82
4.4.2 Estabelecimento de cultura de células em suspensão de <i>S. viridis</i>	83
4.4.3 Curva de crescimento das culturas em suspensão de <i>S. viridis</i>	83
4.4.4 Testes de indução de transdiferenciação de elementos traqueais em culturas de suspensão de <i>S. viridis</i>	83
4.4.5 Identificação e análise filogenéticas de genes ortólogos envolvidos na sinalização de Xilemina e Bixinina em <i>S. viridis</i>	86
4.4.6 Análise de dataset de RNAseq publicado de <i>S. viridis</i> (Martin et al., 2016).....	87
4.4.7 Indução de elementos traqueais ectópicos em cotilédones de <i>A. thaliana</i>	88
5 CAPÍTULO 3 – Estabelecimento de culturas xilogênicas e de um sistema de protoplastos para ensaios de expressão transiente em cana-de-açúcar.	89
5.1 INTRODUÇÃO.....	89
5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
5.2.1 Estabelecimento de calos friáveis e células em suspensão de cana-de-açúcar	92
5.2.2 Teste de indução de transdiferenciação de elementos traqueais nas culturas de suspensão de cana-de-açúcar, com base no protocolo estabelecido para bambu (Ogita et al., 2012).....	94
5.2.3 Teste de indução de transdiferenciação de elementos traqueais nas culturas de suspensão de cana-de-açúcar, com base no protocolo estabelecido para switchgrass (Shen et al., 2013).....	96
5.2.4 Testes de indução de transdiferenciação de elementos traqueais nas culturas de suspensão de cana-de-açúcar, utilizando diferentes compostos que induzem a formação de xilema em eudicotiledôneas	103
5.2.5 Análise histoquímica in vivo dos elementos traqueais de cana-de-açúcar após dissociação dos tecidos	107
5.2.6 Caracterização bioquímica e molecular da cultura xilogênica de cana-de-açúcar ..	109
5.2.7 Estabelecimento de culturas de protoplastos.....	114
5.3 CONCLUSÃO GERAL	117
5.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	121
5.4.1 Indução de calos de cana-de-açúcar a partir de palmito	121
5.4.2 Curva de crescimento celular de cana-de-açúcar	121
5.4.3 Células em suspensão de cana-de-açúcar	121
5.4.4 Testes de indução de elementos traqueais em culturas de suspensão de cana-de-açúcar	122
5.4.5 Análise de microscopia dos elementos traqueais induzidos	124
5.4.6 Análise histoquímica in vivo dos elementos traqueais de cana-de-açúcar após dissociação dos tecidos	124
5.4.7 Quantificação bioquímica da lignina deposita durante o processo de indução de elementos traqueais pelo método de brometo de acetila	124
5.4.8 Extração de RNA, síntese de cDNA e análise de expressão gênica	125
5.4.9 Primers.....	126
5.4.10 Estabelecimento de um sistema de protoplastos a partir de células de suspensão	127
6 CONCLUSÃO FINAL	128
7 BIBLIOGRAFIA.....	132

RESUMO

As características físico-químicas da parede celular constituem um grande gargalo na obtenção dos açúcares fermentáveis a partir dos polissacarídeos de parede celular presentes na biomassa, fato conhecido como recalcitrância da biomassa vegetal. A utilização da biomassa na produção de biocombustíveis requer um melhor entendimento sobre os mecanismos que permeiam os processos de deposição de parede celular e metabolismo de lignina. Nesse contexto, a maior parte do conhecimento foi gerado em espécies eudicotiledôneas, havendo uma significativa lacuna para gramíneas, apesar do seu grande potencial para acúmulo de biomassa. Portanto, há uma necessidade de se estabelecer ferramentas-modelos que permitam elucidar características exclusivas da parede celular secundária de gramíneas C4, cujo conhecimento não pode ser extrapolado a partir de eudicotiledôneas. O presente trabalho propôs estabelecer um sistema de células em suspensão como ferramenta-modelo em estudos sobre parede celular secundária em gramíneas C4. Para tal, três espécies foram incluídas: *Sorghum bicolor*, *Setaria viridis* e cana-de-açúcar. Devido às características recalcitrantes do sorgo, apenas as suspensões celulares de *S. viridis* e cana-de-açúcar foram estabelecidas. Subsequentemente, estas culturas foram utilizadas na tentativa de se desenvolver duas aplicações para o estudo de parede secundária: i) culturas xilogênicas, em que as células em suspensão são induzidas a se transdiferenciar em elementos traqueais; e ii) sistema de protoplastos para ensaios de transativação para testar o potencial papel de fatores de transcrição na regulação transcricional da deposição de parede celular. Somente as culturas de cana-de-açúcar responderam aos tratamentos testados para indução da transdiferenciação de elementos traqueais, baseados em protocolos estabelecidos para outras gramíneas. Análises de expressão gênica por RT-qPCR foram utilizadas para caracterizar a variação da expressão de genes-alvo durante este processo. Ademais, as paredes celulares das células em suspensão de cana-de-açúcar foram digeridas com um coquetel de hidrolases para a produção de protoplastos. A cultura de células em suspensão de cana-de-açúcar e suas aplicações aqui estabelecidas poderão ser utilizadas na elucidação de aspectos únicos do processo de deposição de parede celular secundária em gramíneas C4.

Palavras chave: Gramíneas C4, cultura de tecidos, parede celular secundária, lignina e xilogênese.

ABSTRACT

The physicochemical features of the cell wall represent a major bottleneck for the processing of cell wall polysaccharides present in biomass into fermentable sugars, a fact known as plant biomass recalcitrance. Biofuels production from biomass requires a better understanding on the molecular mechanisms underlying secondary cell wall deposition and lignin metabolism. In this context, most of the current knowledge has been generated in eudicots species, whereas significantly less is known for grasses, despite of their great potential for biomass accumulation. Therefore, the development of tools that allow the discovery of specific aspects of C4 grasses secondary cell walls is of great interest, because this knowledge cannot be extrapolated from data generated for eudicots. In the present work, we aimed to develop suspension cell cultures as a tool for the study of secondary cell wall metabolism in C4 grasses. For this purpose, three species were employed: Sorghum bicolor, *Setaria viridis* and sugarcane. Because of the recalcitrant nature of sorghum, only suspensions cells of *S. viridis* and sugarcane were successfully established. Subsequently, these cultures were used in an attempt to develop two applications to study secondary cell walls: i) xylogenic cultures, in which the suspension cells are induced to transdifferentiate into tracheary elements; and ii) a protoplast system to be used in transactivation assays to test the potential role of transcriptional factors in the regulation of secondary wall deposition. Only the suspension cultures of sugarcane showed a positive response to the tested treatments for the induction of tracheary elements formation, which were based on modifications of previous protocols established for other grasses. Gene expression analysis by RT-qPCR was used to characterize the variation of the expression of target genes during this process. Moreover, the cell walls of sugarcane suspension cells were digested with a cocktail of hydrolases to produce protoplasts, which were used in transactivation assays between transcriptional factors known to be involved in secondary cell wall deposition and their putative target genes, as a proof-of-concept. The sugarcane suspension cells and their applications established in this work might be used to further elucidate unique aspects of secondary cell wall deposition in C4 grasses.

Key words: C4 grasses, tissue culture, secondary cell wall, lignin and xylogenic culture.

LISTA DE ABREVIATURAS

2.4-D - Ácido 2.4-Diclorofenóxiacético

4CL - 4-cumarato:CoA Ligase

ACBR - Brometo de acetila

ACL5 - ACAULIS 5

AIA - Ácido indol-acético

ANA - Ácido Naftalenacético

ASP - Asparagina

AtHB8 - Homeobox Gene 8

BA - Benziladenina

BAP - 6-benzilaminopurina

BES1 - BRI1-EMS-SUPPRESSOR 1

BK - Bikinina

BL - Brassinolide

BMR - Brown Midrib

BY-2 - Bright Yellow 2

C3H - 4-Hidroxinamato 3-Hidroxilase

CA - Carvão Ativado

CAD - Cinamil Álcool Desidrogenase

CCOAOMT - Cafeoil-CoA O-Metiltransferase

CESA - Celulose Sintase

CIM - Callus Induction Medium

CO - Constans

COMT - Cafeato O-metiltransferase

CWR - Cell Wall Residue

DMSO - Dimetilsulfóxido

F5H - Ferulato 5- Hidroxilase

FT - Flowering Locus T

GA3 - Ácido Giberélico

GAPDH - Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase

GFP - Green Fluorescent Protein

GSK3 - Glicogênio Sintase Kinase 3

HD1 - HEADING-DATE1

HD3A - HEADING-DATE3A

KIN - Cinetina

LBD15 - LOB domain-containing protein 15

MP - Monopteros

PEG - Polietilenoglicol

PMT - Putrecina N-Metiltransferase

PRO - Prolina

PUB - Poliubiquitina

TDR - TDIF Receptor

TDZ - Thidiazuron

TMO6 - Target of Monopteros 6

UBE2 - Enzima E2 de Ubiquitinação

VND6 - NAC-domain protein 6

XCP - Xylem Cysteine Peptidase

XY - Xilemina

1. INTRODUÇÃO

1.1 Parede celular

Diferente das células animais, as células vegetais são delimitadas por uma parede celular delgada e rígida, conferindo forma, resistência mecânica, suporte, proteção do protoplasto, junção célula-célula, controle de expansão celular, proteção contra estresse biótico e abiótico e barreira de difusão. Ao mesmo tempo, sua plasticidade permite o alongamento celular e crescimento vegetal, podendo apresentar diferentes arquiteturas, variando em aparência e estrutura conforme o tipo celular de ocorrência (Taiz & Zeiger, 2006; Abramson et al., 2013).

Apesar das diferenças morfológicas observadas de acordo com o tipo celular, de maneira geral as paredes celulares são classificadas em dois tipos: parede celular primária e parede celular secundária. A parede celular primária é extensível e fina (0,1-1 μm), presente em células em desenvolvimento, sendo composta basicamente por celulose, hemicelulose, pectinas e proteínas estruturais (Fig. 1A). Sua formação ocorre durante a citocinese, sendo continuamente sintetizada e remodelada durante a expansão celular (Cosgrove, 2005; Abramson et al., 2013; Zhong & Ye, 2015).

Figura 1. Modelo esquemático da parede celular vegetal. A) Parede celular primária B) Parede celular secundária (Loqué et al., 2015).

A parede celular primária, por sua vez, pode ser dividida em dois grupos, paredes do tipo I e do tipo II, que diferem em relação à estrutura, arquitetura e composição (Carpita & McCann, 2008). Paredes celulares do tipo I estão presentes em eudicotiledôneas, monocotiledôneas não-comelinídeas e gimnospermas, e são compostas por quantidades equivalentes de celulose e xiloglucanos, imersos em uma matriz rica em pectina e proteínas estruturais (Fig. 2). Monocotiledôneas comelinídeas

(incluindo Poaceae) possuem parede celular do tipo II, apresentando como principal hemicelulose o arabinoxilano e (1,3)→(1,4)→β-glucano (também conhecido como glucano de ligação mista ou β-glucano), com menores teores de pectinas e maiores quantidades de compostos fenólicos (Fig. 2) (Ridley et al., 2001; Fry, 2004; Carpita & McCann, 2008; Pauly & Keegstra, 2008; Vogel, 2008).

Figura 2. Esquema estrutural das paredes celulares do tipo I e II, representados pelas paredes de *Arabidopsis thaliana* e arroz (*Oryza sativa*), respectivamente (Yokoyama & Nishitani, 2004)

Quando o crescimento celular cessa, a parede celular secundária pode ser depositada internamente à parede celular primária em alguns tipos celulares especializados, sendo constituída principalmente por celulose, hemicelulose e lignina (Fig. 1B), com conteúdo relativo de cada componente e estrutura variando entre as espécies (Zhong & Ye, 2009; Loqué et al., 2015). A deposição de parede secundária nos elementos traqueais formam padrões específicos, como helicoidal e anelar no protoxilema, que fornece suporte, mas ainda permite o contínuo alongamento, e padrões escalariforme e reticulado no metaxilema (Zhong & Ye, 2009). A presença de parede celular secundária nos elementos traqueais fornece a força mecânica necessária para suportar a pressão negativa no xilema causada pela transpiração, bem como suporte mecânico aos órgãos vegetais (Zhong & Ye, 2009)

A parede celular primária apresenta composição dividida em três domínios: domínio microfibrilar (celulose), domínio denominado matriz (constituído pelos

polissacarídeos não-celulósicos: hemicelulose e pectinas) e domínio das proteínas (Harris et al., 2009). A celulose é o biopolímero mais abundante na terra (Festucci-Buselli et al., 2007), representando cerca de 15-20% da massa seca em parede celular primária e até 40% da parede celular secundária (Sticklen, 2008). As microfibrilas de celulose são formadas pelo “empacotamento” e cristalinização de dezenas de cadeias (1,4) β -glucano, através da atividade da proteína CESA (Cosgrove, 2005). Sua organização se dá de forma paralela umas às outras, promovendo regiões de alta cristalinização, com elevado grau de empacotamento, e regiões amorfas, onde estão organizadas de forma menos compacta (Sticklen, 2008). O domínio fibrilar composto pelas microfibrilas de celulose encontra-se imerso no segundo domínio, formado por uma matriz de polissacarídeos não-celulósicos, as hemiceluloses e as pectinas, que conferem rigidez e resistência à parede (Buckeridge et al., 2000; Cosgrove, 2005). As hemiceluloses são formadas geralmente por um esqueleto de ligações β (1-4) com presença de cadeias laterais, que impedem a formação de estruturas cristalinas (Marriott et al., 2016), formando cadeias longas associadas à celulose através de pontes de hidrogênio (Busse-Wicher et al., 2014). Dependendo da espécie vegetal, as hemiceluloses representam de 20-40% dos polissacarídeos de parede celular (Marriott et al., 2016), podendo apresentar ainda composição variada. Hemiceluloses de Poaceae e gimnospermas são compostas principalmente por grandes quantidades de galactoglucomanas e glucuronoarabinoxilano (GAX), que representam 20-40% da parede primária de gramíneas e 40-50% da parede secundária, enquanto angiospermas lenhosas apresentam principalmente como hemicelulose o glucuronoxilano (GX) (Scheller & Ulvskov, 2010; Abramson et al., 2013). As pectinas são constituídas por uma mistura heterogênea de polissacarídeos que representa cerca de 10-20 % da parede celular primária, desempenhando importante papel na adesão, porosidade e integridade da parede celular (Baron-Epel et al., 1988; Willats et al., 2001). Existem três tipos de pectinas na parede celular vegetal: i) homogalacturananos; ii) raminogalactoronanos-I e iii) raminogalactoronanos-II (Marriott et al., 2016). Finalmente, o terceiro domínio consiste de proteínas estruturais e enzimas, que apresentam grande importância na mobilização dos carboidratos de reserva de parede (Buckeridge et al., 2008).

A lignina também é um constituinte de parede celular, encontrada principalmente nos espessamentos de parede celular secundária dos vasos do xilema, traqueídes e fibras de sustentação. A lignina é um polímero aromático complexo

oriundo do acoplamento oxidativo dos álcoois hidroxicinamil *p*-cumaril, coniferil e sinapil, que diferem entre si pelo grau de metoxilação (Boerjan et al., 2003). Uma vez incorporados ao polímero, estes monômeros, chamados de monolignols, dão origem às subunidades *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (H), respectivamente, cuja abundância relativa varia de acordo com o tipo celular, tecido, fase do desenvolvimento e taxon (Cesarino et al., 2012). Eudicotiledôneas apresentam polímero de lignina composto basicamente por unidades G e S, enquanto gramíneas apresentam quantidades significativas de unidade H e incorporação do flavonóide tricina (Del Rio et al., 2012).

Recentemente, muitos estudos têm se focado nos diversos aspectos do metabolismo de parede celular secundária, visto que esta é o grande constituinte da biomassa vegetal que, por sua vez, pode ser utilizada na produção de diversos produtos nas biorrefinarias, como biocombustíveis e biomateriais (Vanholme et al., 2013). Entretanto, as características físico-químicas da parede celular representam um grande obstáculo para o aproveitamento da biomassa vegetal em processos industriais, fato conhecido como recalcitrância da biomassa vegetal. A estrutura física e as composições químicas da parede limitam o acesso de enzimas hidrolíticas aos seus substratos polissacarídicos, dificultando a eficiente liberação de açúcares fermentáveis para a produção de biocombustíveis, biomateriais e químicos. Assim, diversas estratégias têm sido adotadas como uma forma de maximizar os rendimentos e diminuir a recalcitrância da biomassa vegetal. Pesquisas acerca dos mais diversos aspectos do metabolismo de lignina ganharam importância após estudos mostrarem que este polímero é o principal fator responsável pela recalcitrância da biomassa (Chen & Dixon, 2007; Van Acker et al., 2013). A lignina imobiliza celulasas e enzimas associadas, impedindo o acesso aos seus substratos e afetando negativamente a liberação de monossacarídeos durante a hidrólise enzimática dos polissacarídeos de parede, processo conhecido como sacarificação (Vanholme et al., 2012). Por isso, estratégias de engenharia genética têm focado no desenvolvimento de plantas que acumulam menos lignina ou que sintetizam um polímero mais ameno à degradação. A redução da expressão de genes que codificam enzimas da via de biossíntese em lignina de modo a limitar o fluxo de carbono para a produção deste polímero é a estratégia mais largamente utilizada para a produção de matérias-primas otimizadas (Sewalt et al., 1997; Hu et al., 1999; Goujon et al., 2003; Chen & Dixon, 2007; Novaes et al., 2010; Xu et al., 2011; Min et al., 2012; Van Acker et al., 2014). Não apenas o

conteúdo, mas a composição da lignina também pode afetar o processo de sacarificação da biomassa lignocelulósica (Marriott et al., 2016). Plantas com elevadas proporções de unidades S apresentam aumento nos níveis de sacarificação, devido à maior proporção de ligações do tipo β -O-4, que são mais facilmente quebráveis, e menores proporções de ligações carbono-carbono do tipo β -5 e 5-5, que são mais recalcitrantes (Ralph et al., 2004). No entanto, a manipulação da via de biossíntese de lignina, tanto para redução do conteúdo como para a modificação de sua composição monomérica, requer um conhecimento fundamental do metabolismo fenólico, incluindo as enzimas que catalisam cada passo da via e seus metabólitos intermediários, além de como esta via é regulada ao nível transcricional e (pós)traducional. Portanto, o estabelecimento de ferramentas-modelos que facilitem a caracterização dos mais diversos aspectos da parede celular secundária e do metabolismo de lignina em diferentes grupos de plantas é de grande valia para a proposta bioeconomia.

1.2 Bioenergia

A busca por fontes alternativas e renováveis de energia tem sido motivada pelo crescente consumo mundial de combustíveis fósseis ao longo dos anos. No final do século XIX, o carvão mineral começou a ser substituído pelos derivados do petróleo, que se tornou então fonte de energia dominante, impulsionado pela indústria automobilística. A queima de combustíveis fósseis é uma das principais fontes responsáveis pela emissão de gases de efeito estufa (GEE) e, a partir da segunda metade do século XX, o crescente consumo de energia proveniente de combustíveis fósseis, juntamente com suas consequências negativas sobre as condições ambientais e climáticas, impulsionou a busca por fontes de energia sustentáveis e renováveis. Embora existam muitas fontes de energia renováveis, como energia solar, nuclear, eólica, geotérmica e hidrelétrica, esses recursos não se apresentam como substituintes definitivos do petróleo, visto que este não somente é utilizado para a produção de combustíveis líquidos mas também de uma gama de outros produtos químicos e industriais (Marriott et al., 2016).

A energia renovável oriunda de fontes biológicas, a chamada bioenergia, terá um papel fundamental na substituição dos combustíveis derivados do petróleo e na redução das emissões de dióxido de carbono na atmosfera. Um dos principais produtos da bioenergia é o bioetanol, normalmente produzido pela fermentação de

açúcares solúveis ou amido provenientes da cana-de-açúcar e do milho, respectivamente, e é chamado de bioetanol de primeira geração (Fig. 3). Entretanto, um dos principais empasses para a produção em larga escala do bioetanol de primeira geração em vários países é que a sua utilização requer o uso extensivo de espaço/terra, os quais na maioria das vezes são destinados a suprir as demandas alimentícias, além de suprir apenas uma fração global do combustível requerido (Field et al., 2008; Abramson et al., 2013). Todavia, o bioetanol pode ser produzido a partir do material vegetal lignocelulósico, sendo chamado bioetanol de segunda geração (Fig. 3) (Yuan et al., 2008).

O futuro na segunda geração de etanol

Após o uso do caldo da cana na primeira geração, utilizam-se o bagaço e as folhas no processo de hidrólise. Na etapa final, ocorre a fermentação tradicional por leveduras que transformam os açúcares em etanol.

Figura 3. Produção de bioetanol de primeira geração acoplada à produção de bioetanol proveniente de biomassa lignocelulósica. Fonte Revista FAPESP - (<http://revistapesquisa.fapesp.br/2012/10/11/entre-acucares-e-genes/>).

Lignocelulose refere-se à biomassa vegetal composta pelos polímeros biológicos celulose, hemicelulose e lignina e constitui uma fonte renovável para a produção de biocombustíveis e biomateriais (Fig. 4) (Vanholme et al., 2010). Neste contexto da bioeconomia, a biomassa de origem vegetal é extremamente interessante, pois é uma fonte de energia barata, resultante da eficiente conversão da luz em açúcares simples através dos processos fotossintéticos e fixação do carbono.

Figura 4. Estrutura e organização da biomassa lignocelulósica (Rubin, 2008).

Muitas podem ser as fontes de matéria-prima para a produção de bioetanol de segunda geração, como plantas herbáceas, palhas e bagaços, resíduos lenhosos, resíduos da indústria de papel e celulose e descartes municipais (Fig. 3) (Huang et al., 2009; Abramson et al., 2013). Assim, a escolha da matéria-prima dependerá de uma série de fatores, como relação custo-benefício, infraestrutura disponível, culturas utilizadas, condições climáticas, entre outras. Durante a colheita de muitas culturas destinadas à produção de alimentos, grandes porções de biomassa são desperdiçadas, como palhas e bagaços provenientes da colheita de milho, aveia, arroz, trigo, sorgo e cana-de-açúcar (Gressel, 2008). Esses resíduos constituem importante fonte de biomassa lignocelulósica e podem ser utilizados na produção de biocombustível de segunda geração. Atualmente, estes resíduos têm sido apontados como as principais potenciais matérias-primas a serem utilizadas, com rendimentos de cerca de 1,5 bilhões de toneladas de biomassa lignocelulósica e potencial para a produção de 442 bilhões de litros de bioetanol por ano (Kim & Dale, 2004). Uma das grandes vantagens das palhas e bagaços como matéria-prima para as biorefinarias é que, por serem resíduos agrícolas, sua produção não interfere na produção de alimentos, evitando o conflito “*fuel x food*” e promovendo as chamadas culturas multipropósito.

Resíduos lenhosos também podem ser utilizados como matérias-primas na obtenção do bioetanol lignocelulósico, podendo facilmente serem utilizados como opção energética, especialmente em países com extensas áreas florestais, como Rússia, Brasil, Canadá, Estados Unidos e China, os quais juntos representam mais da metade da área total de floresta do mundo (Abramson et al., 2013). Apenas nos Estados Unidos a porção de área florestal seria capaz de fornecer aproximadamente 368 milhões de toneladas de biomassa seca anualmente (Perlack et al., 2005). Biomassas lenhosas (*softwood* – madeira de gimnospermas - e *hardwood* – madeira de angiospermas) são matérias-primas vantajosas em termos de produção, colheita, armazenamento e transporte quando comparadas a herbáceas (Zhu & Pan, 2010). Essa matéria-prima para a produção de biocombustíveis pode ser proveniente de diferentes fontes como resíduos gerados durante a colheita, resíduos gerados do processamento primário e secundário dos moinhos e resíduos de madeira urbanos (Perlack et al., 2005). Além disso, matérias-primas denominadas *softwood*, geralmente apresentam menores quantidades de pentoses que biomassas agrícolas, favorecendo a conversão do etanol (Zhu & Pan, 2010).

Outras potenciais matérias-primas são as chamadas gramíneas perenes. Estas podem ser facilmente cultivadas em uma gama de condições ambientais, quando comparadas às culturas de produção de bioetanol de primeira geração. Isto se deve pela presença do mecanismo C4 de fotossíntese permitindo elevado acúmulo de biomassa, além de requererem menos recursos para o cultivo (Sanderson & Adler, 2008). Gramíneas como *switchgrass* podem ser facilmente cultivadas em terras marginais e erosivas, sob baixos requisitos de água e nutrientes (Parrish & Fike, 2005), podendo aumentar significativamente seu rendimento em biomassa quando submetidas a adubação com compostos nitrogenados (Muir et al., 2001). Já *Miscanthus* apresenta altos níveis de celulose quando comparada a outras espécies perenes, resultando em rendimento elevado na produção do bioetanol de segunda geração, visto que o aumento linear do conteúdo de celulose é diretamente proporcional à produção de bioetanol proveniente desta matéria-prima (Huang et al., 2009). No entanto, estudos demonstram que a conversão dos açúcares presentes na parede celular de *switchgrass* é menos eficiente quando comparada à outras matérias-primas como palhas de trigo e resíduos lenhosos (Wyman et al., 1992).

O processo de produção do bioetanol de segunda geração envolve muitos passos, incluindo as etapas de colheita e armazenamento da biomassa, pré-

tratamento, hidrólise/sacarificação, fermentação, recuperação dos produtos e tratamento dos resíduos de cada etapa do processo.

Com o objetivo de remover as barreiras recalcitrantes e aumentar a digestibilidade da celulose, vários pré-tratamentos foram desenvolvidos, atuando na alteração da composição química e da estrutura física da biomassa. Esta etapa é responsável por separar os componentes da biomassa, removendo parte da lignina e algumas hemiceluloses, que por sua vez podem ser convertidas em açúcares solúveis, principalmente xilose, arabinose, manose e galactose. A celulose liberada durante as etapas de pré-tratamentos é convertida em açúcar por hidrólise/sacarificação e por fim, os açúcares podem ser fermentados, resultando na produção do bioetanol (Aden et al., 2002; Huang et al., 2009). Entretanto, o pré-tratamento representa um dos passos mais custosos do processo industrial, responsável por cerca de 15 a 20% do investimento total (Vanholme et al., 2013). Assim, a exploração comercial de biocombustíveis de segunda geração depende largamente dos avanços no entendimento de como a estrutura e composição da parede celular afeta a degradação enzimática da lignocelulose, causando a recalcitrância da biomassa. Finalmente, diversas estratégias têm sido desenvolvidas a fim de modificar os fatores que influenciam a recalcitrância da parede celular para otimizar a utilização da biomassa na produção do bioetanol e outros biomateriais (item 1.1).

1.3 Gramíneas

Como uma das maiores famílias de Angiospermas, as gramíneas (Poaceae) são de grande interesse ao homem, incluindo espécies importantes na alimentação, como trigo (*Triticum aestivum*), milho (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*) e cana de açúcar, além de culturas forrageiras, utilizadas na alimentação animal (Souza et al., 2005). Gramíneas apresentam ampla distribuição ecológica, ocorrendo entre os mais diversos habitats, incluindo regiões da Antártida (Kellogg, 1998). A grande diversidade genética da família ocasionou adaptações morfo-fisiológicas que possibilitaram sua ocorrência em ambientes diversificados, como ambientes descampados e secos (Kellogg, 2001). Além de fonte de fibras e nutrientes, gramíneas compreendem grande parte das culturas destinadas ou propostas à bioenergia, como *Miscanthus*, *switchgrass*, milho, cana-de-açúcar e sorgo (Carpita & McCann, 2008; Vermeris,

2011; Abramson et al., 2013; Petti et al., 2013). Os açúcares solúveis de matérias-primas sacarinas e amiláceas, provenientes da cana-de-açúcar e do milho, respectivamente, podem ser utilizados na produção do bioetanol de primeira geração. Além disso, os açúcares presentes na parede celular de gramíneas podem ser utilizados na produção de bioetanol de segunda geração (Vogel, 2008; Cesarino et al., 2016).

Dentre os aspectos que refletem a ampla diversidade de gramíneas, destaca-se a presença da via fotossintética C4. Dentre as 7500 plantas superiores que realizam fotossíntese C4, 4500 são gramíneas (Souza et al., 2005). O mecanismo C4 permite o aumento da assimilação líquida do carbono, devido à presença de especializações morfológicas e bioquímicas (Paterson et al., 2009). Por apresentarem maior eficiência no uso da água e de nutrientes, as gramíneas C4 são capazes de crescer sob condições consideradas severas para plantas C3, como zonas de elevada salinidade, superfícies rochosas e ambientes áridos (Souza et al., 2005). O mecanismo de concentração de CO₂ resulta em vantagens para espécies com fotossíntese C4 em relação a produção de matéria seca, principalmente sob condições de estresse hídrico e elevadas temperaturas (Souza et al., 2005). A eficiência fotossintética das gramíneas C4 possibilita um grande acúmulo de biomassa e subsequentemente aumento nos rendimentos de produção de bioenergia provenientes de matéria-prima lignocelulósica, fazendo deste grupo de plantas potenciais culturas de bioenergia.

Com relação às paredes celulares, gramíneas apresentam paredes primárias do tipo II, compostas de celulose e glucoronoarabinoxilano, imersos em uma matriz com menores quantidades de pectina e proteínas estruturais e quantidades significativas de hidroxicinamatos (ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico) (Carpita & McCann, 2008). O polímero de lignina em gramíneas apresenta quantidades significativas de unidades H, além das unidades G e S, e incorporação de flavonotricina (Del Rio et al., 2012). Ademais, em gramíneas, ácido ferúlico é esterificado às cadeias de arabinoxilano que posteriormente serão ligadas à unidades G da lignina, enquanto ácido *p*-cumárico é esterificado à posição γ da cadeia lateral de unidades S (Riboulet et al., 2009). Tais características revelam que muitos aspectos da parede celular de gramíneas não podem ser estudados e extrapolados a partir de espécies de eudicotiledôneas.

Apesar de sua indiscutível importância cultural e econômica e das diferenças relevantes acerca da parede celular entre gramíneas e eudicotiledôneas, existe uma lacuna no conhecimento acerca dos mecanismos moleculares de deposição de parede celular secundária em gramíneas, e em especial em gramíneas com fotossíntese C4. Portanto, o desenvolvimento de ferramentas-modelo que permitam elucidar características exclusivas da parede celular de gramíneas C4 é essencial para o real entendimento da formação da parede celular neste grupo de plantas e para a exploração do seu potencial bioenergético.

1.4 Cultura de tecidos

As culturas *in vitro* envolvem culturas de células, tecidos ou órgãos em condições assépticas, baseadas em meios que contenham os fatores necessários para o desenvolvimento como água, fontes de carbono, vitaminas, sais minerais e reguladores de crescimento (Oliveira, 2016). Seu desenvolvimento se dá a partir de explantes, que são fragmentos de um organismo vegetal, podendo ser de origem caulinar, foliar e radicular, normalmente dotados de porções meristemáticas (Caldas et al., 1998). Essa técnica é baseada nas propriedades de pluri- e totipotencialidade das células vegetais. A capacidade de uma célula em se diferenciar em diferentes tipos celulares é denominada pluripotencialidade, enquanto a capacidade de uma única célula em gerar um novo indivíduo completo é denominada totipotencialidade (Guerra et al., 1999; Verdeil et al., 2007).

O desenvolvimento e estabelecimento da cultura de tecidos é influenciada principalmente por três fatores: i) o genótipo utilizado; ii) o tipo de explante e iii) a composição do meio de cultura, além das condições de luz, temperatura e umidade (Andrade, 2002; Smith, 2013). Sob as mesmas condições de cultivo, diferentes variedades podem responder de maneiras distintas, visto que esse processo é altamente genótipo dependente. Isso porque a capacidade de resposta, está relacionada provavelmente às variações dos níveis de hormônios endógenos, que são geneticamente estabelecidos (Smith, 2013). Assim, algumas variedades podem ser mais responsivas que outras (Mantell et al., 1994). O tipo de explante influencia de maneira direta tanto no processo de regeneração *in vitro* quanto no tipo de resposta da cultura de tecidos. Isso porque determinados explantes, como embriões e inflorescências, apresentam elevadas proporções de tecidos meristemáticos,

respondendo de forma mais efetiva quando comparado a outros tecidos (Andrade, 2002; Gupta et al., 2006). A composição do meio de cultura, juntamente com as condições de luminosidade, umidade e temperatura, também exercem grande influência, de forma que diferentes composições e concentrações de fitohormônios podem resultar no sucesso ou não do estabelecimento da cultura de tecidos (Smith, 2013). Por exemplo, auxinas são reguladores de crescimento, importantes na divisão celular e iniciação das raízes, contudo em elevadas concentrações, a auxina pode suprimir a morfogênese (Smith, 2013).

Diversas são as aplicações da cultura de tecidos em plantas. Essa técnica permite a recuperação de espécies que estejam ameaçadas de extinção, a regeneração de indivíduos resultantes de cruzamentos de baixa viabilidade, a criação de variação genética somaclonal, possibilitando a obtenção de indivíduos resistentes a estresses bióticos ou abióticos, e ainda a introdução de características de interesse através da produção de plantas transgênicas por engenharia genética (Oliveira, 2016). As técnicas de propagação de células vegetais foram desenvolvidas a partir da década de 1950, quando as células vegetais ganharam destaque na capacidade de sintetizar uma série de moléculas de interesse (Hellwig et al., 2004). Dentro desse contexto, culturas em suspensão de células vegetais tem sido utilizadas como um sistema-modelo no estudo de mecanismos regulatórios do metabolismo secundário vegetal, incluindo fitofármacos, bem como uma excelente ferramenta para micropropagação, melhoramento genético e conservação de recursos genéticos (Lameira et al., 2009).

Células em suspensão, em que as células vegetais são cultivadas e mantidas em meio líquido, podem ser utilizadas no estudo de uma série de processos do desenvolvimento e metabolismo vegetal. Sendo as células vegetais totipotentes, elas são geneticamente aptas a produzirem uma gama de substâncias químicas encontradas durante todo desenvolvimento vegetal (Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002). Assim, as suspensões celulares são ferramentas atrativas para a produção de metabólitos secundários, como antocianinas, carotenóides, taninos e alcalóides (Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002). Além disso, tais culturas têm sido usadas como plataformas para a produção e purificação de proteínas recombinantes devido ao baixo custo, fácil execução e rápido crescimento, além de não apresentarem patógenos humanos e produção de endotoxinas (Hellwig et al., 2004). Entre as principais suspensões celulares para a produção de proteínas

recombinantes estão os cultivares de tabaco, BY-2 e *Nicotiana tabacum* 1. Mais de 20 proteínas recombinantes de interesse foram produzidas em culturas celulares vegetais, incluindo anticorpos, enzimas, hormônios e fatores de crescimento (Hellwig et al., 2004).

Suspensões celulares também podem ser utilizadas na elucidação de eventos relacionados ao metabolismo de parede celular secundária. Por exemplo, a deposição de lignina ocorre apenas em tipos celulares especializados, localizados entre outros tecidos não-lignificados, o que dificulta a caracterização de diversos aspectos do seu metabolismo, como a composição tecido-específica ou o perfil transcriptômico específico de células em lignificação. Por isso, sistemas de células em suspensão induzidas para a diferenciação de elementos traqueais (cuja deposição de parede secundária é intensa) ou para a deposição/formação de lignina constituem uma interessante alternativa no estudo do metabolismo de parede celular secundária e lignina (Kärkönen & Koutaniemi, 2010). De fato, a atividade de diversas enzimas da via dos fenilpropanóides foram primeiramente identificadas em cultura de tecidos (Humphreys & Chapple, 2002). Em 1980, suspensões celulares de *Zinnia elegans* foram utilizadas para analisar os processos de citodiferenciação e formação de elementos traqueais *in vitro*, sendo a primeira cultura xilogênica estabelecida (Fukuda & Komamine, 1980). Esse sistema se mostrou útil no estudo dos eventos moleculares envolvidos na transdiferenciação dos elementos traqueais, nos diversos aspectos do desenvolvimento vascular e na deposição de parede celular. Estas culturas xilogênicas apresentaram fases distintas e bem delimitadas ao longo do processo de formação de elementos traqueais, com expressão diferencial de genes para cada fase (Fukuda, 1997). O estágio I (Fig. 5-I) corresponde à fase de desdiferenciação, onde as células adquirem a capacidade de crescer e se diferenciar, mas não se dividem, e é acompanhado pela expressão de genes induzidos por lesões, genes que codificam inibidores de proteases e genes de identidade procambial. No estágio II, as células restringem seu potencial de desenvolvimento, limitando-se em sua diferenciação em apenas elementos traqueais. Durante este estágio, ocorre a expressão precoce de genes envolvidos na diferenciação dos elementos traqueais. O estágio III envolve a formação de parede celular secundária, autólise do protoplasto e morte celular programada, acompanhado pela expressão de genes envolvidos nesses processos (Fukuda, 1997; Novo-Uzal et al., 2013).

Figura 5. (I) Estágios do processo de transdiferenciação de elementos traqueais em células de *Z. elegans*. Estágio I corresponde à etapa de dediferenciação; Estágio II, as células adquirem a capacidade de se diferenciarem em células do xilema; Estágio III, desenvolvimento e formação de elementos traqueais (Modificado de Fukuda, 1997). (II) Etapas de diferenciação dos elementos traqueais de células do mesofilo de *Z. elegans*. (A) Células do mesofilo no estágio I; (B) Células submetidas a diferenciação no estágio II; (C e D) Células no estágio III, com desencadeamento da morte celular programada e formação do elemento traqueal com lignificação da parede celular (Modificado de Novo-Uzal et al., 2013).

Culturas xilogênicas tem sido uma ferramenta útil em estudos acerca dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento vascular e na deposição de parede celular secundária, incluindo o metabolismo de lignina. Recentemente, Pesquet e colaboradores (2013) demonstraram, a partir de culturas xilogênicas de *Z. elegans*, que o processo de lignificação em elementos traqueais continua após sua morte celular, sendo que os monômeros de lignina são fornecidos por células da cultura que não estão se transdiferenciando em elementos traqueais. Este processo

é chamado de lignificação não-célula-autônoma. Lacayo e colaboradores (2010) investigaram a composição da parede celular e a estrutura dos elementos traqueais em culturas xilogênicas de *Z. elegans*. Eles propuseram um modelo arquitetônico dos elementos traqueais composto de três camadas: i) uma matriz granular externa envolvendo o elemento traqueal; ii) uma parede celular primária composta por uma malha de microfibrilas de celulose; e iii) um espessamento de parede celular secundário interno composto por microfibrilas de celulose dispostas paralelamente e deposição de lignina.

Além do estabelecimento de culturas xilogênicas para se estudar os processos de deposição de parede celular secundária, culturas de células em suspensão também podem ser utilizadas para a produção de protoplastos, células vegetais desprovidas de parede celular após a degradação enzimática. A vantagem de células em suspensão em relação à tecidos vegetais íntegros para a produção de protoplastos é que os processos de degradação enzimática das paredes celulares são favorecidos, uma vez que o contato célula-célula é reduzido. Os trabalhos de transformação genética visando o melhoramento dos cultivares inicialmente envolveram vetores naturais como *Agrobacterium tumefaciens*, porém nesse tipo de transformação é necessário que haja uma interação hospede-hospedeiro, que nem sempre se estabelece. Assim, métodos alternativos foram desenvolvidos para efetuar a transferência do DNA recombinante contendo o gene de interesse para a planta-alvo, como por exemplo biobalística e eletroporação, bem como a utilização de protoplastos, que são ferramentas importantes em estudos genômicos (Oliveira, 2016). Este método é vantajoso, pois plantas transformadas via protoplastos não apresentam quimerismo, visto que são oriundas de um único protoplasto transformado (Oliveira, 2016). Os protoplastos são atualmente utilizados no melhoramento de espécies de interesse agrônomo como citros (Kobayashi et al., 1983), para a obtenção de plantas transgênicas, de mutantes ou variantes somaclonais e híbridos somáticos (Carvalho & Sena, 2007). Além disso, constituem um ótimo sistema para ensaios de transativação, em que se avalia a possível interação entre fatores de transcrição e a região promotora de seus potenciais genes-alvo.

Ensaio de expressão transiente em protoplastos vegetais são ferramentas úteis no estudo de mecanismos moleculares, incluindo sinalização e vias metabólicas, bem como redes de regulação transcricionais (De Sutter et al., 2005). De Sutter e colaboradores (2005) utilizaram protoplastos de tabaco em ensaios de transativação

para investigar potenciais reguladores de genes que codificam enzimas-chaves na biossíntese de nicotina, mediadas por jasmonato. Seus estudos revelaram dois fatores de transcrição, *NtORC1* e *NtJAP1*, responsáveis pelo controle do gene que codifica para PMT, envolvida na produção de nicotina em células BY-2 (De Sutter et al., 2005).

Células em suspensão apresentam muitas vantagens quando comparadas a outros sistemas de cultura de tecidos utilizados no estudo do desenvolvimento vegetal, como: i) a uniformidade de tipos celulares, em contraste com o órgão da planta que possui diversos tipos celulares em diversos estádios de desenvolvimento; ii) possibilidade de se testar a atividade de diferentes compostos em um sistema fechado; iii) uniformidade de tratamento: todas ou a maior parte das células recebem igual estímulo por estarem em contato direto com o meio de cultura; iv) facilidade de isolar compostos e/ou proteínas (inclusive apoplásticas), permitindo então o estudo de funções gênicas e processos relacionados ao desenvolvimento vegetal; v) são importantes ferramentas no estabelecimento de culturas de protoplasto, pois o contato célula-célula é reduzido, facilitando assim a atividade das enzimas de degradação de parede celular. Assim, o estabelecimento de um sistema de células em suspensão pode ser uma importante estratégia complementar para acelerar o ganho de conhecimento acerca de diversos processos do desenvolvimento vegetal, como o metabolismo de parede celular secundária e lignina em gramíneas.

2. OBJETIVOS

O objetivo do trabalho é estabelecer um sistema de células em suspensão como ferramenta para estudos de deposição de parede celular secundária em gramíneas C4. Para tal, duas aplicações são propostas: i) estabelecimento de culturas xilogênicas, e ii) um sistema de protoplastos para ensaios de transativação.

Os objetivos específicos:

- Estabelecer um sistema de células em suspensão em três espécies de gramíneas C4 (*Sorghum bicolor*, *Setaria viridis*, e cana-de-açúcar) a partir de calos friáveis;
- Realizar testes de indução de transdiferenciação de elementos traqueais nas culturas de células em suspensão estabelecidas, utilizando compostos descritos como indutores do desenvolvimento de xilema em eudicotiledôneas e protocolos descritos para culturas xilogênicas em outras gramíneas ou monocotiledôneas;
- Comparação do padrão de deposição de parede secundária entre os elementos traqueais formados nas culturas xilogênicas e aqueles formados durante o desenvolvimento normal da planta por meio de microscopia de luz;
- Quantificação de lignina ao longo do processo de transdiferenciação de elementos traqueais;
- Análise de expressão gênica por RT-qPCR de genes envolvidos na deposição de parede celular secundária durante o processo de transdiferenciação dos elementos traqueais;
- Isolamento de protoplastos a partir da digestão da parede das células em suspensão.

3 **CAPÍTULO 1** – *Sorghum bicolor* – Estabelecimento de cultura de tecidos em sorgo a partir de diferentes tipos de explantes e utilizando diferentes meios de indução.

3.1 **INTRODUÇÃO**

O sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), é uma gramínea pertencente à tribo Andropogoneae, subfamília Panicoideae (Fig. 1A), a qual pertencem grande parte das culturas destinadas à bioenergia, como *Miscanthus*, cana-de-açúcar e *switchgrass* (Paterson et al., 2009; Li & Brutnell, 2011). As variedades de *S. bicolor* apresentam alturas que podem variar de 0,5 a 6 metros. O colmo é dividido em nós e entrenós bem delimitados, podendo ser suculento ou seco, produzindo normalmente uma única panícula terminal que pode variar em arquitetura (Fig. 1B), apresentando mais ramificações que o milho e o arroz e com variações dentro da espécie em número de ramificações primárias, secundárias e terciárias (Brown et al., 2006; Saballos, 2008). Alguns tipos de perfilhamento podem produzir múltiplas panículas (Saballos, 2008). As variedades mais utilizadas de sorgo podem ser divididas em três classificações: (i) sorgos sacarinos, capazes de acumular açúcares no colmo, semelhante à cana-de-açúcar, e normalmente mais altos que outras variedades; (ii) sorgos graníferos, que apresentam elevada produção de sementes e são relativamente menores para facilitar a colheita; (iii) sorgos forrageiros, apresentando alta razão folha-colmo, sendo utilizados principalmente na produção de silagem, pois destacam-se pelo alto acúmulo de biomassa e alto valor nutritivo (Casela et al., 1986; Saballos, 2008; Vermerris, 2011a). O sorgo é uma cultura anual propagada através de sementes (Vermerris, 2011a). Por não apresentarem um sistema de proteção física, como a palha presente no milho e a gluma presente no trigo e na cevada, as sementes de sorgo apresentam elevada produção de compostos fenólicos, que atuam na defesa contra patógenos e animais granívoros (Magalhães et al., 2000).

Figura 1. (A) Relação filogenética de alguns membros da subfamília Panicoideae, dentro da família Poaceae (modificado de Li & Brutnell, 2011); (B) Diferentes arquiteturas da panícula de *S. bicolor* (Shakoor et al., 2014)

O sorgo destaca-se atualmente como o quinto cereal de maior produção no mundo, sendo uma alternativa ao consumo de cereais convencionais como arroz, milho, trigo e cevada. Como alimento, o sorgo apresenta vantagens devido à elevadas concentrações de compostos fenólicos que atuam como antioxidantes, contribuindo na redução de doenças cardiovasculares (Carr et al., 2005), diabetes (Lakshmi & Vimala, 1996), obesidade (Al-Mamary et al., 2001) e câncer (Awika et al., 2009; Yang et al., 2009), além de apresentar grande quantidade de fibras alimentares, agregando valor nutricional (Awika et al., 2005). Ademais, o sorgo apresenta alta resistência ao estresse hídrico, respondendo de maneira mais eficiente ao cultivo sob essas condições quando comparado a outros cereais (Magalhães et al., 2000). A produção de sorgo na América Latina apresenta vantagens devido à sua adaptação a diferentes condições agrícolas, permitindo o cultivo tanto em regiões de clima úmido quanto de clima árido, além de baixo custo na produção (Acosta Sanchez, 2004; Awika et al., 2005; Farrar et al., 2008; Saballos, 2008; Paterson et al., 2009; Pola, 2011). Sua alta eficiência fotossintética, devido ao mecanismo C₄ que compreende especializações bioquímicas e morfológicas que permitem o aumento da assimilação líquida de carbono (Paterson et al., 2009), favorece o acúmulo de biomassa e torna o cultivo de sorgo ainda mais interessante frente a gramíneas C₃ de interesse econômico como arroz, aveia e trigo. Tal característica se mostra vantajosa quando o produto de interesse é a biomassa, que pode ser utilizada em diversas aplicações industriais

como a produção de biocombustíveis e biomateriais e a nutrição animal (Marriott et al., 2016)

Além de vantagens quanto aos requerimentos para cultivo e fotossíntese C4, o sorgo apresenta genoma significativamente pequeno (750 Mbp), diploide e sequenciado, sendo cerca de três vezes menor que o genoma do milho (2 Gbp) e menos complexo que outras culturas energéticas como cana-de-açúcar, além da disponibilidade de protocolos de transformação genética via *A. tumefaciens* e biobalística (Carvalho et al., 2004; Vermerris, 2011; Calviño & Messing, 2012; Liu & Godwin, 2012). A simplicidade genômica de sorgo facilita a realização de estudos funcionais, devido à menor redundância genética. Tais características, associadas à proximidade genética do sorgo com outras gramíneas de interesse econômico, favorecem seu estabelecimento como um promissor modelo para estudos genômicos e funcionais, ampliando o conhecimento sobre mecanismos moleculares em gramíneas (Shakoor et al., 2014).

Além das vantagens discriminadas acima, sorgo ainda apresenta a disponibilidade de mutantes *bmr*, cuja principal característica fenotípica é a coloração marrom em suas nervuras e caule. Essa característica é resultado do menor conteúdo de lignina e diferenças na composição deste polímero aromático (Zhong et al., 2000). Mutantes *bmr* foram encontrados em milho (*Zea mays*), sorgo e *Pennisetum glaucum*, todas gramíneas C4, e curiosamente não foram identificados em gramíneas C3, fato possivelmente explicado pela alta redundância genética e poliploidia observadas em várias espécies como trigo e aveia (Cherney et al., 1988; Sattler et al., 2014). Foram identificados quatro mutantes *bmr* em sorgo através de análises alélicas: *bmr2*, *bmr6*, *bmr12*, afetados nos genes que codificam para as enzimas 4CL, CAD, COMT respectivamente, e *bmr19*, cujo gene afetado ainda não foi mapeado (Saballos et al., 2008). Esses mutantes foram importantes para a caracterização de genes que codificam enzimas da via biossintética dos monolignols em gramíneas C4, sem a necessidade de se utilizar transgenia (Sattler et al., 2014). Em conclusão, mutantes *bmr* são importantes ferramentas para a caracterização da deposição de parede celular e do metabolismo de lignina em gramíneas. Todas essas características mencionadas colocam o sorgo como um potencial modelo, permitindo a realização de estudos funcionais para a determinação de funções gênicas e caracterização de vias metabólicas, além da extrapolação do conhecimento para outras espécies filogeneticamente próximas e de interesse econômico como cana-de-açúcar.

Além de ser um modelo de estudos para gramíneas C4, sorgo foi escolhido pois este projeto de mestrado faz parte de um projeto JP Fapesp (nº 2015/02527-1) atualmente em andamento no nosso laboratório. Este projeto propõe o desenvolvimento de sistemas-modelo em sorgo e sua utilização em uma estratégia de biologia de sistemas focada em transcriptômica e metabolômica para correlacionar mudanças na composição da parede celular secundária com variações de expressão gênica, de modo a permitir a identificação de genes envolvidos nos mais diversos aspectos da deposição de parede celular secundária em gramíneas, com especial foco no metabolismo fenólico e de lignina. Os sistemas a serem desenvolvidos são: (i) um sistema de entrenó em processo de alongamento; e (ii) culturas xilogênicas a partir de células em suspensão. Assim, o trabalho descrito a seguir foi desenvolvido visando o estabelecimento de cultura de tecidos em sorgo para posterior desenvolvimento de protocolos para indução da transdiferenciação de elementos traqueais a partir de células em suspensão, como parte de um contexto maior do projeto JP em execução em nosso laboratório.

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A manipulação eficiente de plantas em cultura de tecidos depende da otimização de diversos parâmetros como escolha de genótipo responsivo, o tipo e idade do tecido utilizado como explante e a composição do meio de indução (Smith, 2013). Além disso, sorgo é considerada uma das espécies vegetais mais difíceis de se manipular em cultura de tecidos (Shrawat & Lörz, 2006). Por esse motivo, e com o intuito inicial de se estabelecer uma cultura de células em suspensão de sorgo, neste trabalho testamos i) 4 genótipos, ii) 5 fontes de explante e iii) diversas composições de meios de indução, incluindo testes com diferentes concentrações de hormônios vegetais e a suplementação com compostos antioxidantes. Vale ressaltar que tal otimização se faz necessária pois, embora tenhamos utilizado protocolos baseados em publicações, todas elas tinham como objetivo a regeneração de plantas completas para a transformação genética, sendo que nosso objetivo era a produção de calos friáveis (calos com células de fácil dissociação) que pudessem ser transferidos para meio líquido para gerar culturas de células em suspensão.

Dentre os genótipos utilizados estão as variedades CSMXS 101B e 101 *bmr*, que foram obtidas da Embrapa Milho e Sorgo e são foco do Projeto JP Fapesp (nº

2015/02527-1) em que se insere este trabalho de mestrado. Já a variedade CMSXS 102B, também obtida da Embrapa, foi utilizada devido a sua capacidade de resposta a cultura de tecidos segundo as condições estabelecidas por Brandão *et al.* (2005), as quais resultou em calos organogênicos. Embora a obtenção de calos organogênicos não seja necessariamente o objetivo deste trabalho, essa variedade foi tratada como um potencial controle positivo no estabelecimento de calos friáveis, uma vez que já responde positivamente à cultura de tecidos. Uma quarta variedade, BRS 330, foi gentilmente doada pelo Prof^o Dr. Marcos Buckeridge (IB/USP) para as análises iniciais do trabalho, visto que as variedades da Embrapa somente foram disponibilizadas meses após o início deste projeto de mestrado. Urge ressaltar que nem todos os genótipos foram testados concomitantemente ou em todos os experimentos. Isto se deve ao fato de termos recebido o material da Embrapa vários meses após o início do projeto e, portanto, estes foram somente utilizados em protocolos mais promissores, a partir dos dados conseguidos com as outras variedades.

A maioria dos estudos que reportam a manipulação de sorgo em cultura de tecidos, todos eles visando a produção de calos embriogênicos ou organogênicos para regeneração de plantas no processo de transformação genética, utilizam embriões imaturos como fonte de explante (Carvalho *et al.*, 2004; Howe *et al.*, 2006; Gurel *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2011; Liu & Godwin, 2012). No entanto, outros tecidos foram propostos, como embriões maduros (Cai *et al.*, 1987) e inflorescências imaturas (Brandão *et al.*, 2012). Explantes com maiores proporções de porções meristemáticas tendem a responder de maneira mais eficiente ao processo de indução de calos (Gupta *et al.*, 2006). Assim, diferentes fontes de explantes, baseadas no relativo sucesso reportado em diferentes publicações foram utilizadas neste estudo: epicótilo de plantas germinadas *in vitro* (Brandão *et al.*, 2005), embrião imaturo (Howe *et al.*, 2006; Hosaka & Carrer, 2014), raiz *in vitro* (modificado de Sai Kishore *et al.*, 2006), palmito (Macedo & Silveira, 2010) e inflorescências imaturas (Brandão *et al.*, 2012) na tentativa de otimizar a resposta à cultura de tecidos e, especialmente, a formação de calos friáveis.

Finalmente, a composição do meio de indução também exerce grande influência sobre a resposta obtida na cultura de tecidos. Não existe um meio de indução universal que promove o crescimento de todos os tipos celulares, sendo que mudanças na composição são frequentemente necessárias para diferentes tipos de

explantes e diferentes propósitos da cultura (Smith, 2013). Além disso, não encontramos publicações reportando protocolos que relatassem a produção eficiente de calos friáveis em sorgo e, devido à alta dependência do genótipo utilizado, o desenvolvimento de um meio de indução para este propósito deve ser feito por tentativa e erro (Smith, 2013), modificando principalmente o tipo e concentração de fitormônios. Assim, diversas composições do meio de indução foram testadas com os diferentes genótipos e fonte de explantes, sejam baseadas em publicações com relativo sucesso na cultura de tecidos, seja partindo de uma estratégia de tentativa e erro com diferentes tipos e concentrações de fitormônios. Importante ressaltar que um dos principais problemas encontrados durante o cultivo *in vitro* de sorgo é a alta produção de compostos fenólicos que prejudicam o desenvolvimento da planta, causam o escurecimento do calo e possível necrose com subsequente morte do tecido (Nguyen et al., 2007). Por esse motivo, aminoácidos como asparagina e prolina, que previnem a produção de compostos fenólicos (Carvalho et al., 2004) e carvão ativado, que apresenta propriedades adsorbtivas, foram utilizados na tentativa de evitar a oxidação excessiva dos calos e obter melhor desempenho no desenvolvimento dos mesmos.

3.2.1 Indução de calos de sorgo a partir do epicótilo

Primeiramente, o protocolo estabelecido por Brandão et al. (2005) foi testado na tentativa de se obter calos friáveis da variedade BRS 330, prontamente disponível no laboratório. Neste protocolo, sementes estéreis são germinadas *in vitro* e uma porção do epicótilo entra em contato com o meio de indução, gerando os calos. Este protocolo foi inicialmente utilizado devido às seguintes vantagens: (i) fácil execução; (ii) alta probabilidade de formação de calos; (iii) resposta de indução de calos em curto período de tempo. Como um dos grandes problemas da cultura de tecidos de sorgo é a produção de compostos fenólicos que causam o escurecimento dos calos e possível morte dos tecidos, variações do protocolo de Brandão et al. (2005) foram produzidas pela adição dos aminoácidos Pro e Asp, que reconhecidamente minimizam a produção de compostos fenólicos e melhoram a indução de calos em sorgo (Raghuwanshi & Birch, 2010), e pela adição de CA, que apresenta propriedades adsorbtivas. A frequência de calos formados por tais protocolos pode ser observada na tabela 1:

Tabela 1. Frequência de calos induzidos a partir do epicótilo de plântulas da variedade BRS330 utilizando o protocolo descrito por Brandão *et al.*, (2005) e suas variações.

Meio de cultura	Número de sementes inoculadas	Número de calos Formados	Frequência de calos Formados (%)
Controle	10	10	100
Controle + CA	10	0	0
Controle + Pro + Asp	10	9	90
Controle + CA + Pro + Asp	10	0	0
Total	40	19	47,5

Os calos se formaram dentro de 12 dias após a inoculação no meio de indução e foram classificados visualmente e histologicamente como calos organogênicos, evidenciados pela presença de porções clorofiladas, que foram observadas ao transferir as culturas do escuro para condição de luz, confirmando a presença de porções foliares (Fig. 2; Fig. 7). Estes calos, no entanto, não foram utilizados no estabelecimento de células de suspensão, pois eram extremamente rígidos e de difícil dissociação, não apresentando caráter friável.

Figura 2. Calos estabelecidos a partir de epicótilo utilizando o protocolo descrito por Brandão *et al.*, 2005 – Variedade BRS 330; classificados visualmente e histologicamente como calos organogênicos.

Os tratamentos contendo carvão ativado não responderam quanto à indução e formação dos calos. Como o carvão tem propriedades adsorptivas não-seletivas, provavelmente a alta concentração utilizada resultou na adsorção tanto dos compostos fenólicos produzidos pelo explante como dos nutrientes e fitomônios

sinalizadores para o processo de indução dos calos. Os tratamentos que não continham carvão ativado se desenvolveram de forma normal, porém apresentando alta oxidação do meio de cultura, mesmo na presença de aminoácidos, o que pode ser evidenciado pelo halo marrom em torno do calo, formado pela liberação de compostos fenólicos no meio.

Ainda utilizando a variedade BRS 330 e no intuito de utilizar o carvão ativado de forma que o mesmo permitisse o desenvolvimento normal dos calos e minimizasse o processo de oxidação do meio, foi realizado um experimento para analisar diferentes concentrações de carvão ativado (1,5 g/L, 1 g/L e 0,75 g/L). Neste experimento, o epicótilo de sementes germinadas *in vitro* foi utilizado como explante em meio de crescimento contendo sais e vitaminas do meio MS suplementado com 30 g/L de sacarose (Tabela 2). Dentre os tratamentos, o que apresentou menor oxidação e melhor desenvolvimento dos calos foi o tratamento contendo 0,75 g/L de carvão ativado, sendo essa concentração utilizada nos experimentos subsequentes. Ainda assim, é interessante observar que a taxa de oxidação dos calos é alta mesmo com a presença de um composto adsorvente, o que demonstra a recalcitrância do sorgo para a cultura de tecidos.

Tabela 2. Taxa de oxidação dos calos em meio de cultura com diferentes concentrações de carvão ativado – Variedade BRS 330.

Nº de explantes	Concentração de carvão ativado (g/L)	Frequência de oxidação após 10 dias (%)	Frequência de oxidação após 20 dias (%)
6	1,5	83,33	100
6	1,0	50	100
6	0,75	16,66	66,66

Inicialmente os experimentos foram realizados utilizando a variedade BRS 330, pois era o único genótipo de sorgo disponível no Departamento no início do projeto. Embora o uso do protocolo de Brandão e colaboradores (2005) e suas modificações não tenha resultado na produção de calos friáveis, optou-se por repetir estes procedimentos com as variedades da Embrapa pelo fato da cultura de tecidos ser um processo altamente genótipo-dependente. Após o recebimento do material (variedades CMSXS 101B, CMSXS 101 *bmr* e CMSXS 102B), o presente protocolo

foi executado como descrito no item 3.4.2 e resultou em alta frequência de formação de calos (Fig. 3; Tabela 3). No caso das variedades CMSXS 101B e 101 *bmr*, houve a formação de calos em todos os explantes inoculados. No entanto, este experimento também resultou em calos classificados inicialmente como organogênicos, uma vez que é possível identificar as porções clorofiladas e regiões de desenvolvimento foliar (Fig. 3). Não foram identificadas porções friáveis nos calos organogênicos formados a partir do protocolo de Brandão et al. (2005) e suas variações, independente do genótipo utilizado. As subculturas foram mantidas no intuito de observar se estas permaneceriam como culturas organogênicas ou se futuramente apresentariam caráter heterogêneo, sendo possível a distinção de porções friáveis. No entanto, as culturas demonstraram caráter cada vez mais organogênico, com extensas porções clorofiladas, bem como intensa produção de compostos fenólicos. Assim, com o decorrer das subculturas, houve oxidação e necrose dos calos, mesmo na presença dos aminoácidos asparagina (Asp) e prolina (Pro) e carvão ativado.

Figura 3. Calos estabelecidos a partir do epicótilo utilizando o protocolo descrito por Brandão et al., 2005 – (A) Variedade CMSXS 101B; (B) Variedade CMSXS 101 *bmr*; (C) Variedade CMSXS 102B. Os calos foram classificados visualmente como organogênicos.

Tabela 3. Frequência de calos induzidos a partir de epicótilo de plântulas das variedades CMSXS 101B, CMSXS 101 *bmr* e CMSXS 102B utilizando o protocolo descrito por Brandão et al., 2005 e suas variações.

Variedade	Número de sementes	Número de calos Formados	Frequência de calos Formados
CMSXS 101B	10	10	100
CMSXS 101 <i>bmr</i>	10	10	100
CMSXS 102B	10	8	80
Total	30	28	93,33

Conclusão. Tanto a utilização de carvão ativado quanto o uso de aminoácidos como prolina e asparagina tiveram efeitos positivos para o estabelecimento e manutenção das culturas, uma vez que acarretam na diminuição da oxidação, prologando o tempo da cultura. Porém, devido às características intrínsecas da cultura de calos em sorgo, que produzem altas quantidades de compostos fenólicos, a longo prazo as culturas sofreram intensa oxidação, culminando na necrose e morte dos calos. Ambos os experimentos resultaram em calos não friáveis, de caráter organogênico, com presença de regiões de desenvolvimento foliar que submetidas a condições de luz, tornam se altamente clorofiladas.

3.2.2 Indução de calos de sorgo a partir de embriões imaturos

Durante os trabalhos de cultura de tecido deste projeto, tomamos conhecimento de uma tese de Mestrado da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) intitulada “*Estabelecimento de protocolo de cultura de tecidos de Sorghum bicolor*”, cujo objetivo era desenvolver um protocolo de regeneração de plantas para a transformação genética de sorgo (Hosaka & Carrer, 2014). Neste trabalho, os autores utilizaram embriões imaturos como fonte de explante e diversas composições de meios de indução e obtiveram quatro tipos de calos classificados de acordo com a sua aparência: branco, friável, seco e mucilaginoso, em frequências distintas. Tendo como base esses resultados, procuramos estabelecer a indução de calos friáveis utilizando a mesma formulação de indução, também utilizando embriões imaturos da variedade BRS330 (Fig. 4).

Figura 4. Embrião imaturo isolado da variedade BRS 330.

Os calos induzidos a partir de embriões imaturos começaram a se formar com cerca de 13 dias, sendo classificados visualmente em um primeiro momento como embriogênicos, devido a presença de estruturas que aparentavam ser embriões globulares em estágio inicial. As análises visuais foram complementadas com análises histológicas que confirmaram os calos como sendo efetivamente calos embriogênicos (Fig. 7). Este experimento resultou em calos inicialmente de aparência branca e extremamente compactos. A frequência de formação dos calos não foi muito pronunciada (Tabela 4) quando comparada à indução a partir de porções do epicótilo.

Tabela 4. Frequência de calos induzidos a partir de embriões imaturos da variedade BRS 330 utilizando o protocolo descrito por Hosaka & Carrer (2014).

Número de embriões inoculados	Número de calos formados	Frequência de calos formados (%)
54	25	46,29

As subculturas foram feitas a cada 21 dias e observou-se que os calos apresentavam maior oxidação com o passar do tempo, provavelmente devido ao aumento na produção de compostos fenólicos. Além disso, as subculturas passaram a apresentar caráter heterogêneo, com porções A) embriogênicas, B) brancas e rígidas, e C) friáveis e translúcidas (Fig. 5). As porções friáveis e translúcidas foram removidas dos calos e subcultivadas, mas rapidamente sofreram oxidação levando à morte dos calos. Além disso, tais porções também foram utilizadas na tentativa de se estabelecer culturas de células em suspensão em sorgo (item 3.2.7).

Figura 5. Calos estabelecidos a partir de embriões imaturos utilizando o protocolo descrito por Hosaka & Carrer (2014). Calos contendo porções diferenciadas quanto ao tipo de classificação (A)

porções embriogênicas, (B) porções brancas e rígidas e (C) porções friáveis e translúcidas – Variedade BRS 330.

Subsequentemente, as variedades CMSXS 101B e CMSXS 101 *bmr* também foram utilizadas no protocolo estabelecido por Hosaka & Carrer (2014). Os calos começaram a se formar com cerca de 7 dias após a indução, apresentando resposta mais rápida do que a variedade BRS330, na qual os calos se formaram com cerca de 13 dias. Além da rápida resposta de indução, as variedades CMSXS 101B e CMSXS 101 *bmr* também apresentaram maiores taxas de formação de calos (Tabela 5).

Tabela 5. Frequência de calos induzidos a partir de embriões imaturos das variedades CMSXS 101B e CMSXS 101 *bmr* utilizando o protocolo descrito por Hosaka & Carrer (2014).

Variedade	Número de embriões inoculados	Taxa de oxidação (%)	Número de calos formados	Frequência de calos formados (%)
CMSXS 101B	125	8,54	12	97,6
CMSXS 101 <i>bmr</i>	150	19,18	13	91,33

Inicialmente os calos apresentaram aparência branca e compacta (Fig. 6A, B) e com o decorrer das subculturas passaram a apresentar intensa oxidação, mesmo com a presença de Pro e Asp e carvão ativado no meio de indução.

Figura 6. Calos formados após 7 dias de indução – Protocolo Hosaka & Carrer (2014) – (A) variedade CMSXS 101B; (B) variedade CMSXS 101 *bmr*.

Diferentemente das respostas obtidas com a variedade BRS330, as variedades

CMSXS 101B e CMSXS 101 *bmr* não apresentaram caráter heterogêneo no decorrer das subculturas, de forma que não houve formação de porções diferenciadas em calos friáveis. Ao contrário, as culturas passaram a apresentar caráter cada vez mais rígido e compacto, com intensa produção de compostos fenólicos e tamanhos cada vez mais diminutos, culminando na oxidação total e morte dos calos.

Conclusão. O protocolo de Hosaka & Carrer (2014) resultou em um sucesso parcial na produção de calos friáveis de sorgo. Somente a variedade BRS330 respondeu de forma parcialmente satisfatória, produzindo calos heterogêneos com pequenas porções friáveis que foram subsequentemente cultivadas e transferidas para o meio líquido na tentativa de se estabelecer uma cultura de células em suspensão. No entanto, este protocolo não evitou as altas taxas de oxidação dos calos e consequente morte dos tecidos. Além disso, as variedades-alvo do projeto JP Fapesp, incluindo o mutante *bmr*, não responderam ao protocolo, produzindo somente calos altamente rígidos e compactos, corroborando mais uma vez que o processo de cultura de tecidos em sorgo é um processo que depende não apenas do tipo de explante e composição do meio de cultura, mas que é influenciado diretamente pelo genótipo utilizado. Assim, é evidente que existem muitos fatores que podem influenciar o sucesso do estabelecimento de cultura de tecidos em sorgo, essencialmente devido às características intrínsecas do genótipo utilizado, bem como a alta produção de compostos fenólicos que, em muitos casos, resulta na inviabilidade da cultura.

3.2.3 Análise histológica dos calos de sorgo

Na tentativa de elucidar o caminho morfogenético (organogênese e/ou embriogênese) dos calos obtidos nos experimentos 1 e 2 (variedade BRS330), dois calos de cada experimento foram submetidos a análises histológicas com coloração por azul de toluidina. Essas análises possibilitaram caracterizar morfo-anatomicamente os calos, permitindo uma classificação mais fidedigna em relação à sua natureza morfogenética. Calos embriogênicos apresentam porções meristemáticas claramente evidenciadas pela presença de regiões de células pequenas com citoplasma denso, envoltas por células maiores e com citoplasma disperso. Ademais, é possível evidenciar, dependendo da angulação do corte, as fases de desenvolvimento do embrião, exceto aquelas caracterizadas no desenvolvimento sexual (Nabors et al., 1983). Por outro lado, calos organogênicos

apresentam tecidos altamente especializados, formação de meristemas apicais da raiz e do caule bem como a presença de primórdios foliares (Nabors et al., 1983). Dessa forma, é possível elucidar se os calos classificados inicialmente de maneira visual como organogênicos e embriogênicos correspondem de fato a essas classificações.

As análises histoquímicas realizadas nos calos provenientes do experimento utilizando epicótilos como explantes (protocolo de Brandão et al., 2005) confirmam as suposições iniciais de que se tratam de calos organogênicos, aqui evidenciados pela presença do meristema apical e primórdios foliares (Fig. 7A). Por outro lado, a análise dos calos induzidos a partir de embriões imaturos (protocolo de Hosaka & Carrer, 2014) sugerem que estes são calos embriogênicos, evidenciados pela presença de embriões no estágio de coração (Fig. 7B). Visto que em alguns casos reportados na literatura, culturas de células em suspensão foram estabelecidas a partir de calos embriogênicos, como aquela estabelecida para a gramínea *switchgrass* (Mazarei et al., 2011), porções friáveis destes calos embriogênicos foram utilizadas na tentativa de se estabelecer uma cultura de células em suspensão em sorgo.

Figura 7. Secção longitudinal do (A) calo organogênico mostrando o meristema apical do caule os primórdios foliares e (B) do calo embriogênico mostrando o embrião somático em estágio de coração. Variedade BRS330.

3.2.4 Indução de calos de sorgo a partir de embriões imaturos e raízes utilizando diferentes concentrações de auxina e cinetina

Os protocolos utilizados previamente resultaram na formação de calos classificados como organogênicos (Brandão et al., 2005) ou predominantemente embriogênicos (Hosaka & Carrer, 2014). Como o foco do trabalho é estabelecer calos

friáveis para subsequente estabelecimento da cultura de células em suspensão, foi realizado um terceiro experimento para testar a combinação de diferentes concentrações de auxina (AIA) e citocinina (KIN), utilizando a variedade BRS330 (Fig. 8), no intuito de verificar se haveriam respostas distintas, dado que as combinações de hormônios utilizados anteriormente não resultaram em calos friáveis. Assim, este experimento permitiu avaliar como os diferentes balanços AIA/KIN afetam a indução de calos. Neste caso, além de embriões imaturos, raízes de plântulas cultivadas *in vitro* foram testadas como fonte de explantes para o estabelecimento dos calos friáveis (Kawata & Ishihara, 1968; Chen et al., 1987). Foram inoculados 3 explantes por placa para ambos os tipos de explante e os mesmos foram submetidos ao tratamento de luz e escuro. Optou-se por também se utilizar luz/escuro uma vez que a luz pode ser um indicativo para determinados processos fisiológicos (Caldas et al., 1998). Além disso, como os calos induzidos a partir de epicótilos apresentaram porções altamente clorofiladas na presença de luz, optou-se por testar neste experimento se as condições de luz e escuro resultariam em respostas distintas.

		Cinetina (mg/L)				
		0	0,1	0,3	0,5	1
Auxina (mg/L)	0	A0	A1	A2	A3	A4
	0,5	B0	B1	B2	B3	B4
	1	C0	C1	C2	C3	C4
	1,5	D0	D1	D2	D3	D4

Figura 8. Combinação de diferentes concentrações de auxina e cinetina utilizadas na indução de calos - Experimento 3. As letras representam as diferentes concentrações de auxina enquanto os números as diferentes concentrações de cinetina.

Em ambos os tratamentos, luz e escuro, não houve diferenças quanto à classificação dos calos para as 20 diferentes combinações hormonais, sendo eles sempre do tipo branco rígido, sem porções friáveis (Tabela 6; Fig. 9A, B). Além disso, em todos os tratamentos e no decorrer das subculturas, os calos foram se tornando

cada vez mais oxidados mesmo com o uso do carvão ativado, culminando na morte dos mesmos. Os explantes de raiz não responderam de maneira positiva para indução de calos (Tabela 7), sendo que na maioria dos casos o material vegetal apresentou alta oxidação seguida de morte (Fig. 9C, D) e em alguns casos isolados, raízes adventícias se formaram.

Figura 9. Indução de calos a partir de embriões imaturos ou raízes cultivadas *in vitro* em diferentes razões AIA/KIN sob luz ou escuro. (A) Calo formado a partir de embrião imaturo submetido a tratamento de escuro, contendo 0 mg/L de AIA e 0,5 mg/l de KIN. (B) Calo formado a partir de embrião imaturo submetido a tratamento de luz, contendo 0 mg/L de AIA e 0,5 mg/l de KIN (C) Raiz submetida a tratamento de escuro, contendo 0,5 mg/L de AIA e 1,0 mg/l de KIN. (D) Raiz submetida a tratamento de luz, contendo 0,5 mg/L de AIA e 1,0 mg/l de KIN.

Tabela 6. Frequência de formação de calos a partir de embriões imaturos da variedade BRS 330 utilizando diferentes razões AIA/KIN sob luz ou escuro.

	Tratamento embriões imaturos	Nº explantes inoculados	Frequência dos calos	Aparência dos calos
Luz	A0	9	66,6	Branco rígido
	A1	9	77,7	Branco rígido
	A2	9	77,7	Branco rígido

	A3	9	66,6	Branco rígido
	A4	9	44,4	Branco rígido
	B0	9	88,8	Branco rígido
	B1	9	77,7	Branco rígido
	B2	9	55,5	Branco rígido
	B3	9	22,2	Branco rígido
	B4	9	66,6	Branco rígido
	C0	9	66,6	Branco rígido
	C1	9	66,6	Branco rígido
	C2	9	100	Branco rígido
	C3	9	55,5	Branco rígido
	C4	9	44,4	Branco rígido
	D0	9	100	Branco rígido
	D1	9	88,8	Branco rígido
	D2	9	88,8	Branco rígido
	D3	9	77,7	Branco rígido
	D4	9	77,7	Branco rígido
	Total	180	71,11	
Escuro	A0	9	66,6	Branco rígido
	A1	9	88,8	Branco rígido
	A2	9	22,2	Branco rígido
	A3	9	44,4	Branco rígido
	A4	9	55,5	Branco rígido
	B0	9	77,7	Branco rígido
	B1	9	77,7	Branco rígido
	B2	9	55,5	Branco rígido
	B3	9	77,7	Branco rígido
	B4	9	66,6	Branco rígido
	C0	9	77,7	Branco rígido
	C1	9	100	Branco rígido
	C2	9	100	Branco rígido
	C3	9	77,7	Branco rígido
	C4	9	66,6	Branco rígido
	D0	9	88,8	Branco rígido
	D1	9	88,8	Branco rígido
	D2	9	66,6	Branco rígido
	D3	9	55,5	Branco rígido

	D4	9	88,8	Branco rígido
Total		180	71,66	

Tabela 7. Frequência de formação de calos em raiz cultivada *in vitro* da variedade BRS 330 utilizando diferentes razões AIA/KIN sob luz ou escuro.

	Tratamento embriões imaturos	Nº explantes inoculados	Frequência dos calos	Aparência dos calos
Luz	A0	9	0	Oxidação e morte do explante
	A1	9	0	Oxidação e morte do explante
	A2	9	0	Oxidação e morte do explante
	A3	9	0	Oxidação e morte do explante
	A4	9	0	Oxidação e morte do explante
	B0	9	0	Oxidação e morte do explante
	B1	9	0	Oxidação e morte do explante
	B2	9	0	Oxidação e morte do explante
	B3	9	0	Oxidação e morte do explante
	B4	9	0	Oxidação e morte do explante
	C0	9	0	Oxidação e morte do explante
	C1	9	0	Oxidação e morte do explante
	C2	9	0	Oxidação e morte do explante
	C3	9	0	Oxidação e morte do explante
	C4	9	0	Oxidação e morte do explante
	D0	9	0	Oxidação e morte do explante
	D1	9	0	Oxidação e morte do explante
	D2	9	0	Oxidação e morte do explante
	D3	9	0	Oxidação e morte do explante

Total	D4	9	0	Oxidação e morte do explante
	Total	180	0	
	A0	9	0	Oxidação e morte do explante
	A1	9	0	Oxidação e morte do explante
	A2	9	0	Oxidação e morte do explante
	A3	9	0	Oxidação e morte do explante
	A4	9	0	Oxidação e morte do explante
	B0	9	0	Oxidação e morte do explante
	B1	9	0	Oxidação e morte do explante
	B2	9	0	Oxidação e morte do explante
	B3	9	0	Oxidação e morte do explante
	B4	9	0	Oxidação e morte do explante
	C0	9	0	Oxidação e morte do explante
	C1	9	0	Oxidação e morte do explante
	C2	9	0	Oxidação e morte do explante
	C3	9	0	Oxidação e morte do explante
	C4	9	0	Oxidação e morte do explante
	D0	9	0	Oxidação e morte do explante
	D1	9	0	Oxidação e morte do explante
	D2	9	0	Oxidação e morte do explante
	D3	9	0	Oxidação e morte do explante
	D4	9	0	Oxidação e morte do explante
	Total	180	0	

Conclusão. Os diferentes balanços de AIA/KIN testados neste experimento resultaram somente em calos rígidos e compactos, sem formação de porções friáveis, independentemente da fonte de explante utilizada ou das condições de luminosidade testadas. Assim como nos experimentos anteriores, os calos apresentaram intensa oxidação no decorrer das subculturas, resultando em necrose e morte dos mesmos.

3.2.5 Indução de calos de sorgo a partir do palmito

Outro material testado como explante na tentativa de obtenção de calos friáveis foram os palmitos, que consistem em lâminas foliares imaturas e sobrepostas, de acordo com o Sistema Kuijper, no qual as folhas são ordenadas de cima para baixo a partir da folha de inserção mais alta com aurícula visível (Scarpari & Beauclair, 2008). Este material foi considerado devido ao sucesso no estabelecimento de calos friáveis em cana-de-açúcar, uma espécie filogeneticamente próxima ao sorgo, quando o palmito foi utilizado como explante (Barbosa & Carrer, 2010). Dessa forma, secções de aproximadamente 5 mm dos palmitos foram inoculados individualmente em 100 tubos de ensaio contendo meio de indução e sais e vitaminas do meio MS suplementado com 30 g/L de sacarose , 0,75 g/L de CA e 1mg/L de 2,4-D (Macedo & Silveira, 2010). Foram obtidos os seguintes resultados de acordo com a tabela 8:

Tabela 8. Formação de calos a partir de explantes de palmito – Variedade BRS330.

Nº de palmitos inoculados	Taxa de contaminação (%)	Taxa de oxidação (%)	Taxa de formação de calos (%)
100	82	8	0

Em 4 dias após a inoculação do palmito, 82% dos explantes estavam contaminados. A contaminação estava exclusivamente sobre o explante e/ou iniciava-se no explante e estendia-se para o meio de cultura. Em nenhum tubo de ensaio foi observado contaminante apenas no meio de cultura, o que sugere que a contaminação possivelmente é decorrente de microorganismos endofíticos e/ou associados aos tecidos vegetais mais internos, uma vez que a assepsia foi realizada nos tecidos externos. Além disso, não houve formação de calos, pois os 8 explantes que não sofreram contaminação oxidaram rapidamente.

Os experimentos utilizando o palmito como fonte de explante foram repetidos utilizando agora uma abordagem mais agressiva de esterilização, em que os

palmitos foram submetidos à assepsia com etanol 70% por três minutos e hipoclorito de sódio 70% por 15 minutos, seguido de três lavagens com água destilada estéril. Esta nova abordagem de esterilização resultou em uma menor taxa de contaminação dos explantes como pode ser observado na tabela 9 a seguir:

Tabela 9. Formação de calos a partir de explantes de palmito – variedade BRS 330.

Nº de palmitos inoculados	Taxa de contaminação (%)	Taxa de oxidação(%)	Taxa de formação de calos (%)
100	7	58	12

A repetição do experimento resultou em diminuição da taxa de contaminação, porém evidenciou uma alta taxa de oxidação tendo 58% dos explantes oxidados, mesmo na presença de carvão ativado. Além disso, 12% dos explantes apresentaram resposta de indução de calo (fig. 10 B, C) após 13 dias de indução.

Figura 10. Estabelecimento de calos a partir do palmito da variedade BRS 330. (A) Palmito antes da inoculação no meio de indução; (B) formação de calo na superfície do palmito inoculado com 13 dias; (C) manutenção do calo na superfície do palmito e oxidação do explante com 21 dias.

Os calos formados na porção superficial do explante de palmito após 21 dias de cultura apresentavam caráter extremamente denso e de difícil dissociação, o que dificultou a manutenção das subculturas. As porções formadas de calos precisaram ser excisadas do explante inicial com o auxílio de um bisturi e então foram transferidas para um novo meio de cultura. No entanto, no decorrer das subculturas os explantes tornaram se cada vez mais oxidados, culminando na necrose e morte dos calos.

Conclusão. A utilização do palmito como fonte de explante, sob as condições testadas, não se mostrou eficaz como em cana-de-açúcar, pois resultou em baixa frequência de formação de calos e intensa oxidação. A conspícua rigidez apresentada pelos calos dificultou as etapas de subcultura, sendo necessário seccionar os calos com o auxílio de um bisturi e para então transferi-los para um novo meio de cultura, de forma que essa excisão proporcionou um estresse adicional às culturas gerando maior oxidação e danos aos calos. Finalmente, não houve formação de calos ou porções de calos friáveis quando os palmitos foram utilizados como explantes.

3.2.6 *Indução de calos de sorgo a partir de inflorescência imatura*

Em sorgo, embriões zigóticos imaturos e inflorescências imaturas são as fontes de explante com maior competência embriogênica e são frequentemente utilizados para a regeneração de diversos cultivares (Brandão et al., 2012). Um estudo relativamente recente comparou a regeneração de plantas por cultura de tecidos a partir de embriões imaturos e a partir de inflorescências imaturas em três genótipos de sorgo. Os resultados mostraram que o potencial de regeneração de inflorescências imaturas foi muito superior ao de embriões imaturos, sendo a sua performance muito semelhante nos três genótipos estudados (Gupta et al., 2006). De acordo com os autores, a superioridade das inflorescências como explante é devido à sua alta proporção de tecidos meristemáticos em comparação a embriões imaturos. Desse modo, inflorescências imaturas das quatro variedades empregadas previamente no projeto foram utilizadas como fonte de explante na tentativa de se estabelecer calos friáveis.

As inflorescências imaturas foram seccionadas em cortes de aproximadamente 5 mm e inoculadas em diferentes meios de indução:

- A. 1 mg/L de 2,4-D (Hosaka & Carrer, 2014);
- B. 1 mg/L de 2,4-D e 1 mg/L de BAP (Brandão et al., 2005);
- C. 2.5 mg/L de 2,4-D e 0,2 mg/L de KIN (Brandão et al., 2012).

Embora Brandão e seus colaboradores (2012) evidenciaram que o genótipo CMSXS 102B apresentou maior competência na resposta a indução de calos a partir de inflorescências imaturas, em nossos experimentos apenas a variedade CMSXS 101B apresentou resposta positiva (Fig. 11) quando submetidas ao meio de indução

contendo 2.5 mg/L de 2,4-D e 0,2 mg/L de cinetina (Brandão et al., 2012). As demais variedades (CMSXS 101 *bmr*, CMSXS 102B e BRS 330) não apresentaram respostas de indução de calos em nenhum dos tratamentos utilizados.

Figura 11. Calos estabelecidos a partir de inflorescências imaturas da variedade CMSXS 101B utilizando o protocolo descrito por Brandão et al. 2012. Calos contendo porções diferenciadas quanto ao tipo de classificação (A) porções embriogênicas, (B) porções organogênicas e (C) diminutas porções friáveis.

Os calos estabelecidos a partir de inflorescências imaturas da variedade CMSXS 101B possuíam caráter heterogêneo (Fig. 11), apresentando porções embriogênicas (Fig. 11A), organogênicas, identificadas pela presença de regiões com desenvolvimento foliar (Fig. 11B), e diminutas porções friáveis (Fig. 11C) que foram excisadas do explante inicial e subcultivadas no intuito de se obter apenas culturas de calos com caráter friável. No entanto, essas porções sofreram rápida e intensa oxidação, mesmo na presença de carvão ativado, inviabilizando a continuidade das culturas. Ademais, os explantes iniciais também passaram a apresentar intensa oxidação após dois ciclos de subcultivo, resultando na morte dos calos.

Conclusão: Embora inflorescências imaturas apresentem alta proporção de tecidos meristemáticos, atuando como explantes de alta competência na indução de calos, nossos experimentos demonstraram que apenas a variedade CMSXS 101B respondeu de maneira positiva para a formação de calos. Tais resultados contrastam com os dados reportados por Brandão e seus colaboradores (2012), que observaram que a variedade CMSXS 102B apresentou maior aptidão na indução e formação de

calos embriogênicos em relação às demais variedades. Assim, é evidente que a resposta ao estabelecimento de cultura de tecidos em sorgo é altamente genótipo-dependente e influenciada pelos componentes do meio de cultura e das condições de crescimento dos explantes.

3.2.7 Estabelecimento de células em suspensão em sorgo

No decorrer das subculturas dos calos heterogêneos obtidos a partir de embriões imaturos (Fig. 5), pequenas porções friáveis foram removidas e introduzidas em meio líquido na tentativa de se estabelecer a cultura de células em suspensão de sorgo. As porções friáveis foram cuidadosamente maceradas e colocadas em meio *CIM* (Hosaka & Carrer, 2014) líquido, permanecendo sob agitação 120 rpm, 25°C no escuro.

As culturas de células em suspensão estabelecida a partir destas regiões friáveis apresentaram porções densas e granulosas e oxidação no meio de cultura, provavelmente decorrente da produção de compostos fenólicos. Grânulos de carvão ativado foram utilizados na tentativa de diminuir os processos de oxidação. Assim, tanto os calos que deram origem às culturas de suspensão quanto as células em suspensão apresentaram intensa oxidação, evidenciando uma característica intrínseca desta espécie vegetal que dificulta significativamente os trabalhos com cultura de tecidos (Cai et al., 1987). A microscopia de luz revelou que a cultura de suspensão apresenta caráter heterogêneo, sendo composta por uma pequena quantidade de células isoladas e também de grandes associações celulares que resultam na formação de pequenos calos na suspensão (Fig. 12).

Figura 12. (A) Cultura de células em suspensão de sorgo produzida a partir de porções friáveis de calos induzidos de embriões imaturos da variedade BRS330. (B) Análise por microscopia de luz mostrando que a cultura é formada tanto por células isoladas e quanto por grandes associações celulares.

Conclusão. As culturas de células em suspensão estabelecidas a partir de porções friáveis dos calos induzidos de embriões imaturos da variedade BRS330 apresentaram baixa taxa de crescimento celular e intensa oxidação, mesmo na presença de grânulos de CA, resultando na morte da cultura. Assim a densidade celular da cultura não foi satisfatória para o subcultivo, sendo impossível o real estabelecimento de cultura de células em suspensão de sorgo a partir destas pequenas porções friáveis. Todos os resultados obtidos durante este projeto corroboram os dados reportados na literatura referente às dificuldades encontradas no estabelecimento de cultura de tecido em sorgo, devido às suas características recalcitrantes.

3.3 CONCLUSÃO GERAL

A manipulação genética de sorgo emergiu como uma alternativa ao melhoramento clássico, visando a introdução de características desejáveis devido à grande importância econômica desta cultura, além de permitir a realização de estudos funcionais para elucidar características exclusivas de gramíneas (Pola, 2011). Uns dos passos cruciais e indispensáveis durante os protocolos de transformação genética convencionais envolve o estabelecimento de cultura de tecidos para regenerar as plantas transformadas (Oliveira, 2016). Dentro desse contexto, o estabelecimento de cultura de tecidos é de extrema importância, pois caracteriza um passo-chave para o

sucesso na obtenção de plantas transgênicas na maioria das espécies vegetais. Este fato tem impulsionado ainda mais os estudos em cultura de tecidos, visto que tais culturas não somente auxiliam na elucidação de processos celulares e fisiológicos, mas também são ferramentas importantes em estudos aplicados. Este tema é de especial interesse em sorgo, visto que esta espécie é considerada uma das mais difíceis de se manipular em cultura de tecidos (Shrawat & Lörz, 2006; Pola, 2011).

Muitos são os fatores cruciais que influenciam a eficiência de indução de calos e regeneração vegetal, incluindo fonte de explante, composição do meio de cultura e genótipo (Rakshit et al., 2010). No entanto, a alta produção de compostos fenólicos também se apresenta como um fator limitante no estabelecimento das culturas. Assim, estratégias podem ser adotadas para minimizar a produção de compostos fenólicos e a consequente oxidação dos explantes como o uso dos aminoácidos asparagina e prolina e carvão ativado (Zhao et al., 2000; Carvalho et al., 2004; Raghuwanshi & Birch, 2010). Nos resultados obtidos, evidenciamos que o uso destes aminoácidos foi importante para a formação de calos com base nos protocolos de Brandão et al. (2005) e Hosaka & Carrer (2014). No entanto, embora tenham sido utilizados em praticamente todos os experimentos aqui reportados, em todos esses casos houve significativa oxidação e morte dos calos. Os resultados obtidos neste projeto corroboram que a produção de compostos fenólicos é um dos principais impedimentos no estabelecimento de culturas de tecidos em sorgo (Cai et al., 1987), mesmo quando tratados com aminoácidos e carvão ativado.

Fitohormônios também são importantes no estabelecimento de culturas de tecido, pois atuam como sinalizadores nos processos divisão, proliferação e manutenção celular. Pola e seus colaboradores (2011) evidenciaram que o meio de cultura livre de hormônios não apresentou nenhuma resposta morfológica em explantes foliares de sorgo ao longo de três semanas, enquanto meios de cultura contendo 2 mg/L de 2,4-D e 2 mg/L de ANA resultaram na alta frequência de calos com embriões somáticos. Além disso, o uso combinado de 2 mg/L de 2,4-D com 0.5 mg/L de zeatina e cinetina melhoraram a indução dos calos, aumentando a frequência de resposta de 72% para 100%. No trabalho aqui apresentado, também foram testados diferentes tipos, concentrações e combinações de fitohormônios no intuito de se induzir a formação de calos friáveis nas variedades de sorgo utilizadas. De fato, a utilização do hormônio 2,4-D, com base nos protocolos descritos por Brandão et al (2005) e Hosaka & Carrer (2014) foi fundamental para a indução da formação de calos,

mesmo que esses tenham apresentado caráter organogênico ou heterogêneos, respectivamente. A importância destes fitormônios foi também evidenciada pelo fato de os tratamentos que continham elevada concentração de carvão ativado não resultarem na formação dos calos. Visto que o carvão ativado atua como um composto adsorvente não-seletivo, ele adsorve tanto os compostos fenólicos produzidos pelo material vegetal quanto os nutrientes e hormônios presentes no meio de indução.

Cinco diferentes tipos de explantes foram utilizados. Muitos trabalhos relatam que explantes com altas proporções de tecidos meristemáticos exercem maior influência sobre a resposta na indução de cultura de tecidos, como inflorescências imaturas (Brandão et al., 2005; Gupta et al., 2006). Neste trabalho, baixa eficiência no estabelecimento de calos foi observada a partir de inflorescências imaturas, no qual apenas a variedade CMSXS 101B respondeu de maneira positiva, resultando em calos de caráter heterogêneo. Importante notar que os trabalhos realizados por Brandão e seus colaboradores (2012) demonstraram que a variedade CMSXS 102B foi a que apresentou maior competência na resposta à indução de calos a partir de inflorescências imaturas. Tal observação sugere que mesmo sob condições similares de meio de cultura, os diferentes genótipos podem apresentar respostas distintas. Assim, como os genótipos, a composição do meio de cultura e a fonte de explante foram as mesmas utilizadas tanto em nosso trabalho como no trabalho de Brandão e seus colaboradores (2012), é possível que outros fatores possam estar envolvidos nas distintas respostas encontradas, como a janela de tempo específica de coleta das panículas imaturas. A resposta de explantes provenientes de panículas imaturas pode estar limitada a uma janela extremamente específica de tempo durante o desenvolvimento vegetal, de forma que panículas em diferentes estágios de desenvolvimento possivelmente respondem de maneira distinta quando inoculadas em meio de cultura indutor.

Tanto explantes provenientes de epicótilos de plântulas cultivadas *in vitro* quanto embriões imaturos possibilitaram a formação de calos organogênicos e heterogêneos com base nos protocolos de Brandão et al (2005) e Hosaka & Carrer (2014), respectivamente. Contudo, apenas o calos heterogêneos, provenientes de embriões imaturos (Hosaka & Carrer, 2014), apresentaram porções friáveis, de forma que esses foram os melhores resultados obtidos dentre todas as combinações aqui testadas para o posterior estabelecimento das culturas de células em suspensão. Embora praticamente a totalidade dos trabalhos em cultura de tecidos em sorgo

tenham sido direcionados para a regeneração de plantas, estes protocolos foram aqui utilizados no intuito de se estabelecer calos friáveis, visto que o processo de cultura de tecidos em sorgo é altamente genótipo-dependente e influenciado pelo tipo de explante. Assim, a produção de calos heterogêneos proporcionou a utilização das porções friáveis no estabelecimento das culturas de células em suspensão, pois não obtivemos sucesso no estabelecimento de calos 100 % friáveis. No entanto, as culturas de células em suspensão não puderam ser mantidas por longos ciclos de subcultivo pois apresentaram baixa taxa de crescimento. O crescimento limitado da cultura pode ser decorrente do meio de cultura utilizado, pois muito embora tenhamos utilizado o mesmo meio de cultura que foi efetivo na formação dos calos heterogêneos, apenas sem o gelificante, é provável que, sob condições de cultura de suspensão, seja necessário a otimização dos componentes do meio. A baixa taxa de crescimento celular também pode ser reflexo da elevada produção de compostos fenólicos que, quando acumulados, inibem o crescimento celular.

Em conclusão, nenhum dos cinco tipos de explantes utilizados resultaram na formação de calos friáveis de maneira satisfatória, apresentando respostas distintas frente a cultura de tecidos. Apenas quando embriões imaturos foram inoculados no meio de cultura descrito por Hosaka & Carrer (2014) houve formação de calos de caráter heterogêneo com pequenas porções friáveis, que foram utilizadas na tentativa de se estabelecer as suspensões celulares. Estas apresentaram baixa taxa de crescimento e elevada produção de compostos fenólicos, não possibilitando sucessivos ciclos de repicagem e seu real estabelecimento como cultura de células em suspensão. A intensa produção de compostos fenólicos foi uma das principais barreiras encontradas no decorrer do trabalho, pois resultou na oxidação e morte dos calos em todos os experimentos realizados, independentemente do tipo de explante, genótipo ou composição do meio de cultura. Assim, diante das dificuldades encontradas no estabelecimento de cultura de tecidos em *S. bicolor*, outras duas espécies foram utilizadas neste projeto, *Setaria viridis* e cana-de-açúcar, no intuito de se estabelecer um sistema de células em suspensão para ser utilizado como ferramenta-modelo no estudo de parede celular secundária em gramíneas C4, como será descrito nos capítulos seguintes.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 *Material vegetal e condições de cultivo*

Sementes de *S. bicolor* variedades BRS 330 (concedidas pelo Profº Dr. Marcos Buckeridge, IB/USP), CMSXS 101B, CMSXS 101 bmr e CMSXS 102B (Embrapa Milho e Sorgo – Sete Lagoas/MG), foram cultivadas em casa de vegetação sob regime de dias longos (ciclos de 16h:8h luz:escuro) e temperaturas entre 22 e 29°C, utilizando solo e adubação apropriados até o aparecimento da panícula. O desenvolvimento das plantas foi acompanhado de acordo com a fonte de explante a ser utilizada na cultura de tecidos. Para embriões imaturos, sementes imaturas foram colhidas dez dias após o aparecimento das anteras, e dissecadas em ambiente estéril para a aquisição dos embriões. No caso dos palmitos, um segundo conjunto de plantas foi utilizado com 60 a 75 dias de cultivo sob as mesmas condições, as quais tiveram suas folhas removidas até que sobrassem apenas as folhas internas e a porção meristemática central. No caso das inflorescências, as plantas foram cultivadas até antes do aparecimento da *flag leaf*, quando foram coletadas e tiveram suas folhas removidas, deixando apenas a região central do colmo contendo a inflorescência imatura. Protocolos que utilizaram outras fontes de explante são descritos em seção específica.

3.4.2 *Indução de calos de sorgo a partir do epicótilo*

Sementes de *S. bicolor* das variedades BRS 330, CMSXS101B, CMSXS101 bmr e CMSXS 102B foram imersas em etanol 70% durante dois minutos. Em seguida, tiveram o tegumento esterilizado com solução de hipoclorito de sódio 50 % e Tween 20 e lavadas em água destilada estéril. As sementes foram secas com papel filtro estéril e então inoculadas em meio próprio para indução de calos (CIM; Brandão et al., 2005), contendo sais e vitaminas do meio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 30 g/L de sacarose, 1,25 mg/L de CuSO₄, 1 g/L de 2,4-D, 1 g/L de BAP. Uma vez germinadas, as plântulas tiveram sua porção inicial do epicótilo removidas e transferidas para um novo meio CIM fresco. Foram realizados 4 tipos de formulações para indução dos calos, tendo como base o protocolo descrito em Brandão et al. (2005):

- a) Controle (Brandão et al., 2005).
- b) Meio controle suplementado com 2 g/L de CA.
- c) Meio controle suplementado com 1 g/L de Asp e 1g/L de Pro.

d) Meio controle suplementado com 1 g/L de asparagina, 1 g/L de prolina e 2 g/l de carvão ativado.

As culturas foram mantidas no escuro a 25°C. Após 4 semanas, os calos foram divididos em porções de 2 mm e transferidos para seus respectivos meios de indução frescos.

3.4.3 Indução de calos de sorgo a partir de embriões imaturos

Testes para indução de calos utilizando embriões imaturos seguiram o protocolo descrito por Hosaka & Carrer (2014). Os embriões foram inoculados em meio de indução contendo sais e vitaminas do meio MS suplementado com 30 g/L de sacarose, 2 g/L de asparagina, 1 g/L de prolina e 1 mg/L de 2,4-D. As culturas foram mantidas no escuro a 25°C e subcultivadas após 4 semanas.

3.4.4 Indução de calos de sorgo sob diferentes concentrações e razões hormonais, utilizando embriões imaturos e raiz cultivada *in vitro*

Como o experimento com base no protocolo descrito por Hosaka & Carrer (2014) resultou em calos classificados visualmente como embriogênicos, apresentando apenas pequenas porções friáveis, um terceiro experimento foi realizado com o intuito de originar calos predominantemente ou exclusivamente friáveis que possibilitassem o estabelecimento das culturas de células em suspensão. Para tal, optou-se por utilizar diferentes combinações e concentrações dos fitormônios auxina e citocinina. Embriões imaturos e raiz cultivada *in vitro* foram usados como explantes e inoculados em meio de indução contendo sais e vitaminas do meio MS suplementado com 30 g/L de sacarose e diferentes concentrações de AIA 0 mg/L, 0.5 mg/L, 1 mg/L e 1.5 mg/L e diferentes concentrações de KIN 0 mg/L, 0.1 mg/L, 0.2 mg/L, 0.5 mg /L e 1 mg/L. As culturas foram mantidas no escuro e na presença de luz a 25°C e subcultivadas após 4 semanas.

3.4.5 Indução de calos de sorgo a partir de palmito

Plantas com aproximadamente 30 cm de altura (de 60 a 75 dias de plantio) tiveram seus palmitos (toda a extensão do colmo – nó e entrenó) desfolhados de forma que sobrassem apenas as folhas mais internas aos palmitos, os quais foram submetidos à assepsia com etanol 70 % por dois minutos e hipoclorito de sódio 50% por 15 minutos, seguido de três lavagens com água destilada estéril. O palmito foi

cortado em secções transversais de aproximadamente 5 mm que foram utilizadas como explante e inoculadas individualmente em tubo de ensaio contendo 15 mL do meio de cultura com os sais e vitaminas do meio MS suplementado com 30 g/L de sacarose, 1 mg/L de 2,4-D e 0,75 g/L de carvão ativado (Macedo & Silveira, 2010). As culturas foram mantidas no escuro a 25°C e subcultivadas após 4 semanas.

3.4.6 Indução de calos de sorgo a partir de inflorescência imatura

As inflorescências imaturas foram esterilizadas por dois minutos com etanol 70% seguido de três lavagens sequencias com água destilada estéril. As inflorescências então foram seccionadas em cortes de aproximadamente 5 mm e transferidas para os seguintes meios de indução:

a) sais e vitaminas do meio MS suplementado com 1 mg/L tiamina HCl, 7,5 mg/L de glicina, 100 mg/L de asparagina, 100 mg/L de mio-inositol, 0,2 mg/L de cinetina, 2,5 mg/L de 2,4-D e 30 g/L de sacarose (Brandão et al., 2012);

b) sais e vitaminas do meio MS suplementado com 30 g/L de sacarose, 2 g/L de Asp, 1 g/L de Pro e 1 mg/L de 2,4-D (Hosaka & Carrer, 2014);

c) sais e vitaminas do meio MS suplementado com 30 g/L de sacarose, 1,25 mg/L de CuSO₄, 1 mg/L de 2,4-D, 1 mg/L de BAP (Brandão et al., 2005; Macedo & Silveira, 2010).

As culturas foram incubadas no escuro à 25 °C e transferidas após 4 semanas para um meio de indução fresco.

3.4.7 Células em suspensão de sorgo

A tentativa de se estabelecer uma cultura de células em suspensão em sorgo seguiu uma adaptação do protocolo descrito para *switchgrass* (Mazarei et al., 2011). Cerca de 1.0 g de pequenas porções friáveis que surgiram de calos heterogêneos da variedade BRS330, estabelecidos com base no protocolo de Hosaka & Carrer (2014), foram gentilmente fragmentadas e transferidas para frascos contendo 30 mL de meio CIM líquido (contendo sais e vitaminas do meio MS suplementado com 30 g/L de sacarose, 2 g/L de Asp e 1 g/L de Pro) e incubadas em agitadores a 120 rpm, 25 °C no escuro. As subculturas foram repicadas a cada 21 dias, sendo produzidas a partir de 3 mL da cultura inicial e mantidas sob as mesmas condições de agitação e temperatura das culturas iniciais.

3.4.8 *Análise histológica dos calos obtidos*

Os calos obtidos nos experimentos de indução referentes aos protocolos de Hosaka & Carrer (2014) e Brandão et al (2005) foram fixados em solução de formol: ácido acético: álcool 50% (90:5:5 v/v), desidratados em série etílica iniciando com etanol 30% até atingir etanol 100%, com trocas overnight a cada aumento de 10% e por fim iniciou-se o processo de pré-inclusão utilizando as razões 1:1, 1:2, 1:3 e 1:0 de xilol e etanol respectivamente e por fim, os calos foram emblocados em parafina (Kraus & Arduin, 1997). Secções de 3-5 µm foram obtidas com micrótomo rotativo e coradas com azul de toluidina 0,05%. Este composto cora tecidos lignificados, suberizados ou com presença de taninos em azul esverdeado e tecidos não lignificados em roxo. Os cortes foram visualizados em microscópio ótico Zeiss Axio Imager M2 equipado com câmera Zeiss AxioCam HRc.

4 CAPÍTULO 2 – Estabelecimento de calos friáveis e cultura de células em suspensão em *Setaria viridis*.

4.1 INTRODUÇÃO

Setaria viridis pertence à tribo Paniceae, que é irmã da tribo Andropogoneae dentro da subfamília Panicoideae, à qual pertencem as principais culturas destinadas a bioenergia como cana-de-açúcar, milho, sorgo e *Miscanthus* (Fig. 1A, B) (Li and Brutnell, 2011b; Petti et al., 2013b). *S. viridis* originou-se na Ásia, sendo domesticada há cerca de 8000 anos atrás no norte da China (Hunt et al., 2008), e desde então espalhou-se em uma extensa gama de habitats em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (Dekker, 2003). Sua domesticação, que acredita-se ter originado a espécie *S. italica*, foi decorrente de uma grande capacidade de adaptação a distintos ambientes, somado ao baixo requerimento para crescimento e elevada produção de sementes (Li et al., 1945; Wet & Harlan, 1975).

Figura 1. A) Relação filogenética dos membros da subfamília Panicoideae, à qual pertencem as principais culturas destinadas a bioenergia (modificado de Brutnell et al., 2010); B) *Setaria viridis* (Modificado de Brutnell et al., 2015).

Apesar da grande importância econômica e ecológica de gramíneas, a maior parte do conhecimento acerca da fisiologia e desenvolvimento das plantas foi gerado em espécies de eudicotiledôneas (Brutnell et al., 2010). O lento progresso na elucidação de características específicas do metabolismo e desenvolvimento de gramíneas C4 pode ser explicado, pelo menos em parte, pela ausência plantas-

modelo e de ferramentas genéticas e genômicas bem estabelecidas. Ao longo dos anos, a herbácea e eudicotiledônea *Arabidopsis thaliana* foi amplamente utilizada como o grande modelo para estudos genéticos, de desenvolvimento e de respostas a estresses bióticos e abióticos (Li & Brutnell, 2011). Entretanto, eudicotiledôneas e monocotiledôneas, as quais compreendem grande parte das culturas de interesse econômico, divergiram entre 127 – 175 milhões de anos atrás (Bell et al., 2010; Smith et al., 2010), possibilitando assim a ocorrência de grandes diferenças em relação ao desenvolvimento, morfo-anatomia, fisiologia e funções gênicas. Muito embora o conhecimento produzido em *A. thaliana* possa servir como base para outras espécies, determinadas características não podem ser elucidadas ou extrapoladas devido à possível distância filogenética ou à completa ausência em *Arabidopsis*, como os mecanismos de fotossíntese C4 e CAM, a fixação biológica de nitrogênio em nódulos produzidos pela interação com *Rhizobium*, e a parede celular do tipo II (Brutnell et al., 2015). No caso de gramíneas, muitos estudos têm utilizado o milho como promissor modelo. No entanto, o ciclo de vida longo, o grande porte, a ausência de protocolos de transformação eficientes e as dificuldades na cultura de tecidos impulsionaram a busca por outros sistemas-modelos (Li & Brutnell, 2011; Brutnell et al., 2015).

Recentemente, outras espécies foram propostas como modelo para gramíneas, a fim de permitir a elucidação de características moleculares intrínsecas desse grupo, como é o caso de arroz (*Oryza sativa*) e *Brachypodium distachyon* (Vogel, 2008). Embora o arroz apresente importante valor econômico, o tempo de geração de vários meses, os grandes requerimentos para cultivo e o fato de apresentar fotossíntese C3 (Brutnell et al., 2015) são grandes barreiras no seu estabelecimento como potencial modelo para estudos funcionais em gramíneas. Por outro lado, *B. distachyon* emergiu como um potencial modelo genético pelo menor tempo de geração, pequeno porte, menor requerimento para cultivo, genoma relativamente pequeno e sequenciado e protocolos de transformação eficientes (Brkljacic et al., 2011; Brutnell et al., 2015). Entretanto, mesmo dentro de gramíneas existem diferenças fisiológicas importantes, sendo a principal e mais notável os diferentes mecanismos fotossintéticos (Petti et al., 2013b). Enquanto *B. distachyon* é uma gramínea de clima temperado e com fotossíntese C3, a maior parte das gramíneas de interesse econômico apresentam fotossíntese C4, ocorrendo em ambientes tropicais e semi-tropicais (Brutnell et al., 2015). Assim, embora muitos modelos pareçam promissores, é necessário o estabelecimento de modelos que

permitam a realização de estudos funcionais e consequentes avanços no conhecimento sobre características distintas dentro de gramíneas.

Neste contexto, *Setaria viridis* tem sido apontada como um excelente modelo para estudos funcionais em gramíneas C4. Esta espécie possui diversas características desejáveis para um modelo: (i) baixa estatura (10-15 cm); (ii) ciclo de vida curto (normalmente de 6 a 9 semanas); (iii) alta produção de sementes (cerca de 13000 sementes por planta); (iv) genoma diploide, relativamente pequeno (cerca de 510 Mb) e sequenciado (Phytozome; <http://phytozome.jgi.doe.gov>). A falta de protocolos de transformação eficientes era um dos grandes gargalos para a realização de estudos funcionais em gramíneas, sendo a cultura de tecidos e a regeneração das linhagens transgênicas os principais problemas. Recentemente, protocolos de transformação convencionais (via cultura de tecidos) foram estabelecidos para *S. viridis*, apresentando significativa taxa de eficiência, chegando a cerca de 29% (Martins et al., 2015). Além disso, protocolos via spike/floral dip também foram desenvolvidos, sendo muito atrativos em relação aos métodos de transformação genética convencionais, uma vez que não necessitam do trabalho intensivo e altamente genótipo-dependente da cultura de tecidos (Martins et al., 2015; Saha & Blumwald, 2016). Assim, além das características biológicas e fisiológicas mencionadas anteriormente que possibilitam o estabelecimento de *S. viridis* como um potencial modelo, a disponibilidade de protocolos de transformação permite avaliar a função de genes nos mais diversos aspectos do desenvolvimento e do metabolismo de gramíneas C4. Por ser filogeneticamente próxima às principais culturas destinadas à produção de biocombustíveis, *S. viridis* também tem sido apontada como uma promissora plataforma de validação de estratégias biotecnológicas para redução da recalcitrância da biomassa vegetal. Neste contexto, estudos recentes revelaram que a composição da parede celular e as taxas de conversão de celulose em açúcares fermentáveis em *S. viridis* são equivalentes às encontradas em culturas bioenergéticas (Petti et al., 2013b).

Desde que *S. viridis* foi apontada com um potencial modelo para gramíneas C4, diversas ferramentas genéticas e genômicas tem sido geradas, como protocolos de transformação genética (Martins et al., 2015; Saha & Blumwald, 2016), disponibilização de dados de transcriptoma em larga escala (Xu et al., 2013; John et al., 2014; Ding et al., 2015), e estabelecimento de genes de referência para qPCR (Martins et al., 2016). Entretanto, a cultura de tecidos não tem sido explorada como

ferramenta de estudos e todo conhecimento gerado foi direcionado para o estabelecimento de protocolos de transformação genética. Brutnell e colaboradores (2010) estabeleceram tais protocolos com culturas de calos embriogênicos em *S. viridis* induzidos a partir de sementes maduras, baseando-se em protocolos descritos para *B. distachyon* e *S. italica* (Rao et al., 1988; Vogel & Hill, 2008). Martins e colaboradores (2015) também estabeleceram calos embriogênicos a partir de sementes maduras, os quais foram utilizados para a realização de transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*. Em ambos os trabalhos citados, os autores obtiveram calos embriogênicos e de aparência friável, embora nada mais tenha sido mencionado a respeito da natureza destes calos, visto que o enfoque dos trabalhos era apenas usar a cultura de tecidos para regenerar plantas transgênicas.

Dessa forma, o presente trabalho propôs estabelecer uma cultura de calos friáveis a partir de semente maduras de *S. viridis* e posterior estabelecimento de células em suspensão para servir como ferramenta de estudos sobre de parede celular secundária em gramíneas C4. Como mencionado acima, embora muitas ferramentas de estudos têm sido desenvolvidas para a gramínea-modelo *S. viridis*, até o presente momento não foram publicados trabalhos que relatassem o estabelecimento de culturas de suspensão na espécie. As suspensões celulares foram utilizadas na tentativa de estabelecer culturas xilogênicas, visto que estas possibilitam a elucidação de processos relacionados a deposição de parede celular secundária, metabolismo de lignina, morte celular programada, além de outros estudos funcionais.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 Indução de calos e estabelecimento de cultura de células em suspensão em *Setaria viridis*

A indução de calos em *S. viridis* foi realizada a partir de embriões maduros como descrito por Martins e seus colaboradores (2015). Os calos se formaram com cerca de 11 dias após a indução e inicialmente apresentaram características friáveis (Fig. 2A). Após 4 semanas, os calos foram subcultivados em meio de indução fresco e permaneceram com aparência de friáveis. Durante o primeiro ciclo de subcultivo, parte dos calos friáveis foram utilizados no estabelecimento das culturas de células em suspensão (Fig. 2B).

Figura 2. Estabelecimento de cultura de tecidos em *S. viridis*. (A) Indução de calos a partir de embrião maduro. (B) Cultura de células em suspensão estabelecidas a partir dos calos friáveis. (C) Morfologia das células na cultura de suspensão. (D) Curva de crescimento da cultura de suspensão.

A curva de crescimento celular de *S. viridis* (Fig. 2D) apresentou um padrão esperado, apresentando i) fase de latência entre o primeiro e o quinto dia, no qual não houve crescimento celular; ii) fase exponencial, entre o sexto e décimo quarto dia, demonstrando crescimento acentuado; e por fim, iii) fase de desaceleração do crescimento celular, com diminuição da taxa de crescimento após o décimo quinto dia de análise. Assim, inicialmente o ciclo de subcultivo das suspensões celulares foi determinado com base na curva de crescimento, que reflete um único ciclo de cultivo, sendo ele de 21 dias. Entretanto, ao longo dos seguidos ciclos de repicagem tanto os calos quanto as suspensões celulares passaram a apresentar oxidação celular. Esse problema foi minimizado ao diminuir o tempo de subcultivo das culturas de calos e das suspensões celulares de 21 dias para 15 dias, aumentando a viabilidade das culturas. Em comunicação com os autores do protocolo que utilizamos para indução da

formação dos calos (Martins et al., 2015), descobrimos que o processo de oxidação é comum após seguidos ciclos de subcultivo dos calos, causando também a diminuição da eficiência de transformação genética (Martins et al., 2015). Desse modo, houve a sugestão de frequentemente iniciarmos novas culturas a partir de embriões maduros de modo a evitar excessivos ciclos de subcultura. De fato, esta proposta é extremamente interessante visto que o uso de embriões maduros como explante (oriundos de sementes também maduras que podem ser estocadas até o uso) ao invés de embriões imaturos evita o constante e laborioso cultivo de plantas para a coleta de sementes em fases muito específicas do desenvolvimento reprodutivo, como sugerido em todos os protocolos publicados para sorgo. Assim, novas sementes foram frequentemente inoculadas em meio de indução para a produção de calos friáveis, enquanto paralelamente as culturas de suspensão foram mantidas.

As culturas de células em suspensão de *S. viridis* apresentaram caráter heterogêneo, contendo células de aparência diminuta e porções com grandes associações celulares, resultando em pequenos calos na suspensão (Fig. 2C). As culturas foram filtradas em mesh 60 (0,191 mm de diâmetro da malha) produzindo dois tipos distintos de culturas de células em suspensão: (i) uma cultura formada por células pequenas e dissociadas; (ii) uma cultura formada por células que se associam em pequenos calos (Fig. 2C). Este processo foi feito seguindo o trabalho em *switchgrass* em que 3 tipos de culturas foram estabelecidas após filtragem com diferentes tamanhos de peneiras e que foram analisadas em microscopia eletrônica de varredura: i) tipo arenosa, composta por células grandes e frequentemente alongadas; ii) tipo leitosa, com células pequenas e geralmente arredondadas; iii) tipo ultrafina, apresentando tanto células pequenas e arredondadas quanto células alongadas (Mazarei et al., 2011). Em seu trabalho, Mazarei e colaboradores (2011) avaliaram a resposta dessas diferentes culturas para isolamento de protoplastos, evidenciando que a cultura leitosa foi a que apresentou a maior taxa de isolamento (de até 106 protoplastos por grama de célula), enquanto as culturas arenosa e ultrafina apresentaram taxas bem mais baixas. Assim, a proposta inicial era estabelecer dois tipos de culturas de células em suspensão em *S. viridis* para avaliar se as diferenças na morfologia e tamanho das células afetaria o processo de transdiferenciação de elementos traqueais, a ser induzido em fases posteriores do projeto. No entanto, no caso de *S. viridis*, ambos os tipos de cultura apresentaram intensa oxidação após a filtragem, impedindo sua manutenção e utilização em experimentos posteriores. Este

resultado pode ser reflexo de um possível estresse produzido pelo processo de filtração. Dessa forma optou-se pela utilização das culturas sem o processo de filtração para a continuidade do trabalho e para a realização dos testes de indução de diferenciação de elementos traqueais.

Conclusão. O uso de embriões maduros de *S. viridis* resultou em eficiente formação de calos, que apresentaram natureza friável. Estes calos foram utilizados no estabelecimento da cultura de células em suspensão. A taxa de crescimento destas culturas foi determinada, apresentando um ciclo de 21 dias, e o perfil da curva de crescimento teve clara delimitação entre as fases de latência, exponencial e estacionária da cultura. No entanto, a curva de crescimento reflete apenas um ciclo de subcultivo, neste caso de 21 dias, de forma que ao longo dos seguidos ciclos de repicagem, as culturas passaram a apresentar oxidação, e o tempo de subcultivo passou de 21 dias para 15 dias, minimizando o processo de oxidação das células e permitindo a manutenção efetiva da cultura, as quais puderam ser utilizadas nos experimentos de indução de elementos traqueais. As culturas de células em suspensão apresentaram caráter heterogêneo, contendo células de aparência diminuta e porções com grandes associações celulares, resultando em pequenos calos na suspensão.

4.2.2 Testes de indução de transdiferenciação de elementos traqueais nas culturas de suspensão de *S. viridis*, com base no protocolo estabelecido para bambu (Ogita et al., 2012)

O estabelecimento das culturas de células em suspensão em *S. viridis* possibilitaram a realização dos experimentos de indução de transdiferenciação de elementos traqueais. Culturas xilogênicas são culturas em que a manipulação da composição do meio permite a indução da transdiferenciação de células em suspensão em elementos traqueais, que são tipos celulares com intensa deposição de parede secundária e, portanto, são excelentes ferramentas para estudos sobre deposição de parede celular secundária, metabolismo de lignina e morte celular programada. Os primeiros testes de indução de transdiferenciação basearam-se no protocolo já estabelecido para culturas xilogênicas de bambu (Ogita et al., 2012), uma espécie monocotiledônea assim como *S. viridis*. Assim, as células em suspensão de *S. viridis* foram previamente filtradas e 300 mg foram transferidos para o meio de

indução (30 mL) contendo diferentes concentrações de hormônios vegetais (Tabela 1). Urge notar que Ogita e colaboradores (2012) ressaltaram a importância da presença de sacarose no meio de cultura para a indução da formação de elementos traqueais. De fato, a sacarose não somente funciona como fonte de carbono, mas também tem um papel sinalizador no processo de lignificação (Rogers et al., 2005). Por isso, todos os meios de indução testados foram suplementados com sacarose. As culturas permaneceram sob agitação 120 rpm, a 25°C no escuro. A cada sete dias, uma alíquota de 1 mL de cada tratamento foi retirada e analisada em microscopia de luz. Todavia, não foi possível observar a formação de elementos traqueais em nenhum dos tratamentos utilizados e em nenhum dos pontos de coleta ao longo das 4 semanas de experimento (Tabela 1).

Tabela 1. Tratamentos utilizados em culturas de células em suspensão de *S. viridis* para indução da transdiferenciação de elementos traqueais, de acordo com o protocolo estabelecido para bambu (Ogita et al., 2012). O sinal positivo (+) indica a presença e o sinal negativo (-) indica a ausência de elementos traqueais.

Tratamento	1° Semana	2° Semana	3°Semana	4° Semana
2,4-D 10 µM	-	-	-	-
2,4- D 30 µM	-	-	-	-
BA 10 µM	-	-	-	-
BA 30 µM	-	-	-	-
ANA 10 µM	-	-	-	-
ANA 30 µM	-	-	-	-
GA ₃ 10 µM	-	-	-	-
GA ₃ 30 µM	-	-	-	-
TDZ 10 µM	-	-	-	-
TDZ 30 µM	-	-	-	-

Conclusão: Em nenhum dos 10 tratamentos utilizados houve formação de elementos traqueais, ao longo das quatro semanas. É possível que o processo de indução de elementos traqueais em culturas de suspensão de *S. viridis* não responda às mesmas condições hormonais e ambientais estabelecidas para bambu, o que pode ser explicado por uma certa distância filogenética, embora ambas as espécies sejam monocotiledôneas. Por essa razão, outros protocolos foram utilizados na tentativa de induzir a formação de elementos traqueais nas culturas de *S. viridis*, que serão descritos nos tópicos seguintes.

4.2.3 Testes de indução de transdiferenciação de elementos traqueais nas culturas de suspensão de *S. viridis*, com base no protocolo estabelecido para *switchgrass* (Shen et al., 2013) e combinação com a citocinina tidiazuron (TDZ)

Shen e seus colaboradores estabeleceram um protocolo para indução da transdiferenciação de elementos traqueais e estudo do processo de lignificação em culturas de suspensão de *switchgrass* utilizando combinações de brassinolide (BL) e 2,4-D (Shen et al., 2013). Este protocolo foi utilizado em uma segunda bateria de testes de indução em células de suspensão de *S. viridis*, devido à sua proximidade filogenética com *switchgrass*. Assim, foram testadas algumas combinações de diferentes concentrações de brassinolide e 2,4-D (Tabela 2), a partir do trabalho de Shen et al. (2013). Além disso, esses hormônios foram combinados com a citocininas TDZ, visto que tal hormônio gerou resultados positivos em cana-de-açúcar (Capítulo 3 deste trabalho). Durante o decorrer de quatro semanas, alíquotas de 1 mL das culturas induzidas foram analisadas semanalmente. Não houve formação de elementos traqueais em nenhum dos 19 tratamentos utilizados ao longo das quatro semanas. Além de não apresentarem respostas na indução, as culturas de células passaram a apresentar oxidação entre a terceira e quarta semana em todos os tratamentos e em especial nos tratamentos contendo TDZ.

Tabela 2. Tratamentos utilizados em culturas de células em suspensão de *S. viridis* para indução da transdiferenciação de elementos traqueais, de acordo com o protocolo estabelecido para *switchgrass* (Shen et al., 2013) e com base nos resultados obtidos para cana-de-açúcar (capítulo 3). O sinal positivo (+) indica a presença e o sinal negativo (-) indica a ausência de elementos traqueais.

Tratamento	1° Semana	2° Semana	3° Semana	4° Semana
2,4-D 10 µM + 0 µM BL	-	-	-	-
2,4- D 10 µM + 0,2 µM BL	-	-	-	-
2,4- D 10 µM + 1 µM BL	-	-	-	-
2,4-D 10 µM + 2,5 µM BL	-	-	-	-
2,4- D 10 µM + 10 µM BL	-	-	-	-
2,4- D 0 µM + 0,2 µM BL	-	-	-	-
2,4- D 0 µM + 1 µM BL	-	-	-	-
2,4- D 0 µM + 2,5 µM BL	-	-	-	-
2,4- D 0 µM + 10 µM BL	-	-	-	-
2,4- D 10 µM + 10 µM TDZ + 0 µM BL	-	-	-	-
2,4- D 10 µM + 10 µM TDZ + 0,2 µM BL	-	-	-	-
2,4- D 10 µM + 10 µM TDZ + 1 µM BL	-	-	-	-
2,4- D 10 µM + 10 µM TDZ + 2,5 µM BL	-	-	-	-
2,4- D 10 µM + 10 µM TDZ + 10 µM BL	-	-	-	-
2,4- D 0 µM + 10 µM TDZ + 0 µM BL	-	-	-	-

2,4- D 0 μ M + 10 μ M TDZ + 0,2 μ M BL	-	-	-	-
2,4- D 0 μ M + 10 μ M TDZ + 1 μ M BL	-	-	-	-
2,4- D 0 μ M + 10 μ M TDZ + 2,5 μ M BL	-	-	-	-
2,4- D 0 μ M + 10 μ M TDZ + 10 μ M BL	-	-	-	-

Conclusão: Embora diferentes concentrações de 2,4-D e brassinolide tenham sido testadas, abrangendo desde baixa até alta razão auxinas/brassinosteróides, não houve indução de diferenciação de elementos traqueais nas culturas de *S. viridis*. Tais resultados demonstram que mesmo alta proximidade filogenética não garante sucesso no uso de protocolos previamente desenvolvidos, como no caso entre *switchgrass* e *S. viridis*. Além disso, mesmo quando a citocinina TDZ foi utilizada em combinação com os outros fitormônios, não houve transdiferenciação de elementos traqueais nas culturas de *S. viridis*, diferentemente do observado em cana-de-açúcar (Capítulo 3), no qual a presença de ao menos dois, dos três hormônios testados induziram a transdiferenciação de elementos traqueais, independentemente das concentrações utilizadas. Assim, a proximidade filogenética entre as espécies não garante uma eficiente reprodução dos protocolos. Estes resultados também indicam que o processo de transdiferenciação em *Setaria* possa ser coordenado por outros fatores e/ou estimulado por outras concentrações ou combinações de hormônios, denotando mais uma vez a complexidade de se estabelecer culturas xilogênicas.

4.2.4 Utilização de diferentes concentrações e combinações hormonais na indução de elementos traqueais

O processo de indução de elementos traqueais é dependente não apenas da responsividade do tecido ou célula vegetal utilizada, mas também dos hormônios utilizados e suas concentrações. Muitos trabalhos reportam o papel essencial de diferentes hormônios vegetais neste processo. Os primeiros trabalhos relatando a transdiferenciação de elementos traqueais em culturas de células isoladas do mesófilo de *Zinnia elegans* reportam o uso combinado de auxina (ANA) e citocinina (BA) (Fukuda, 1997), com taxas de transdiferenciação de até 8,7 % sob elevada razão BA/ANA. A importância da citocinina BA como indutor da diferenciação de elementos traqueais foi também reportada para bambu, resultando numa taxa de transdiferenciação de 25% (Ogita et al., 2012). Outras citocininas, como a KIN também foram utilizadas em protocolos de transdiferenciação de elementos traqueais, como o reportado para discos foliares de *A. thaliana* (Kondo et al., 2015). Neste caso, a

presença de KIN, combinada com o 2,4-D e BK, conduziram para a produção ectópica de elementos traqueais. A importância dos hormônios vegetais neste processo foi ressaltada pelos autores uma vez que a BK sozinha não é capaz de induzir a transdiferenciação, sendo indispensável a utilização tanto de auxina quanto de citocinina (Kondo e Fukuda, 2015). Assim, neste trabalho optou-se por testar diferentes combinações e concentrações hormonais tendo como referência os dois experimentos anteriores (itens 4.2.2 e 4.2.3) e os dados reportados na literatura sobre os efeitos de hormônios vegetais na indução de elementos traqueais. Neste experimento, foram testados: i) dois tipos de citocinina (BA x KIN); ii) diferentes razões auxina/citocinina; e iii) presença/ausência de brassinosteróides. As culturas de células em suspensão induzidas de acordo com a tabela 4 permaneceram sob agitação 120 rpm, a 25°C no escuro, sendo analisadas a cada 7 dias. No entanto, também não foi observada a formação de elementos traqueais em nenhum dos tratamentos utilizados e em nenhum ponto de coleta (Tabela 3).

Tabela 3. Combinações hormonais utilizadas na indução de elementos traqueais em células de suspensão de *S. viridis*

Tratamento	1° Semana	2° Semana	3° Semana	4° Semana
2,4-D 10 µM + BA 10 µM + 0 µM BL		-	-	-
2,4-D 10 µM + BA 10 µM + 0,2 µM BL	-	-	-	-
2,4-D 10 µM + BA 10 µM + 2,5 µM BL	-	-	-	-
2,4-D 10 µM + BA 10 µM + 10 µM BL	-	-	-	-
2,4-D 10 µM + KIN 10 µM + 0 µM BL	-	-	-	-
2,4-D 10 µM + KIN 10 µM + 0,2 µM BL	-	-	-	-
2,4-D 10 µM + KIN 10 µM + 2,5 µM BL	-	-	-	-
2,4-D 10 µM + KIN 10 µM + 10 µM BL	-	-	-	-
2,4-D 10 µM + KIN 30 µM + 0 µM BL	-	-	-	-
2,4-D 10 µM + KIN 30 µM + 0,2 µM BL	-	-	-	-
2,4-D 10 µM + KIN 30 µM + 2,5 µM BL	-	-	-	-
2,4-D 10 µM + KIN 30 µM + 10 µM BL	-	-	-	-
2,4-D 3 µM + KIN 10 µM + 0 µM BL	-	-	-	-

2,4-D 3 μ M + KIN 10 μ M + 0,2 μ M BL	-	-	-	-
2,4-D 3 μ M + KIN 10 μ M + 2,5 μ M BL	-	-	-	-
2,4-D 3 μ M + KIN 10 μ M + 10 μ M BL	-	-	-	-

Conclusão: Diversos compostos recentemente descritos e combinações hormonais que induzem a transdiferenciação de elementos traqueais em eudicotiledôneas foram utilizados, mas não foi observada a formação de elementos traqueais em nenhum dos tratamentos. Estes resultados sugerem que o processo de diferenciação do xilema não é necessariamente conservado entre eudicotiledôneas e gramíneas, embora ao menos parte dos genes envolvidos nas diversas vias de sinalização responsáveis pela formação do xilema sejam encontrados no genoma de gramíneas. É possível que outros fatores não explorados possam estar envolvidos neste processo em gramíneas, ou mesmo nesta espécie em questão. Finalmente, não podemos excluir a possibilidade de termos utilizados os reguladores corretos, mas em condições de indução inadequadas, como concentração ou proporção entre hormônios.

4.2.5 Testes de indução de transdiferenciação de elementos traqueais nas culturas de suspensão de *S. viridis*, utilizando diferentes compostos que induzem a formação de xilema em eudicotiledôneas

Muitos trabalhos de indução de elementos traqueais utilizam diferentes combinações e concentrações de hormônios vegetais (Yamamoto et al., 1997; Ogita et al., 2012; Shen et al., 2013; Yoshimoto et al., 2016). No entanto, alguns compostos sintéticos foram recentemente identificados como indutores da formação de xilema na planta-modelo *Arabidopsis thaliana*, e validados em outras espécies eudicotiledôneas. Kondo e colaboradores (2015) evidenciaram que o composto BK (4-[(5-bromo-2-pyridinyl) amino]-4-oxobutanoic acid) atua diretamente na cascata de sinalização de TDIF-TDR, uma via que regula a diferenciação de células do xilema a partir de células do procâmbio (Kondo & Fukuda, 2015). TDIF-TDR são responsáveis por ativar proteínas chamadas GSK3, que atuam como repressoras do fator de transcrição BES1, e assim inibem a diferenciação de células do procâmbio em células do xilema. Na presença de brassinosteróides, GSK3s são inibidas, liberando BES1 para ativar a via de diferenciação de células de xilema (Fig. 3B). A BK atua como inibidor de GSK3s,

impedindo sua ação inibitória sobre BES1, que por sua vez pode atuar de maneira positiva na diferenciação de células do xilema (Fig. 3B)(Kondo & Fukuda, 2015). A partir desta descoberta, estes autores desenvolveram um protocolo de diferenciação de elementos traqueais em cotilédones e discos foliares de *Arabidopsis thaliana* pelo simples tratamento com BK (Kondo et al., 2015). Este processo de sinalização da formação do xilema em *Arabidopsis*, bem como o ponto de ação da BK, podem ser observados na figura 3B. Assim, procuramos por genes ortólogos a GSK3s de *Arabidopsis* no genoma de *Setaria viridis* e encontramos ao menos uma cópia de cada membro, para todos os subclados dentro da família gênica (Fig. 3A). Tal informação demonstra que os potenciais alvos para a ação da BK estão presentes em *S. viridis*, dando suporte para a realização dos testes de transdiferenciação. Primeiramente, desenvolvemos o protocolo descrito por Kondo e colaboradores (2015) para testar se, nas nossas condições, BK de fato induzia a diferenciação de elementos traqueais em cotilédones de *Arabidopsis*. Como pode ser observado na figura 3C, BK consegue disparar a transdiferenciação massiva de células do mesofilo em elementos traqueais após 4 dias de tratamento em cotilédones de *A. thaliana*. Após esta confirmação, testamos o uso de BK nas células em suspensão de *S. viridis*, utilizando duas concentrações distintas do composto: 10 μ M (a mesma concentração utilizada nos ensaios com *Arabidopsis*) e 20 μ M (caso o efeito da BK fosse menor em gramíneas). No entanto, não foi possível observar a formação de elementos traqueais em nenhum dos tratamentos (dados não mostrados). Visto que a BK também não induziu a transdiferenciação em culturas de cana-de-açúcar (ver item 5.2.4 do capítulo 3), é possível que a via de sinalização inibida por BK não seja completamente conservada entre eudicotiledôneas e gramíneas ou que não encontramos as condições ideais para a indução da formação de elementos traqueais disparada por BK.

Figura 3. Bikinina é um composto que induz a formação de elementos traqueais em *Arabidopsis* pela inibição de GSK3s, quinases envolvidas na via de sinalização TDIF-TDR. A) Análise filogenética por *Maximum Likelihood* de proteínas da família GSK3 em *Arabidopsis thaliana*, arroz e *Setaria viridis*. Os valores nos ramos representam análise de suporte por Shimodaira-Hasegawa approximate likelihood-ratio test e ultrafast bootstrap, respectivamente. B) Via de sinalização TDIF-TDR que controla a formação de xilema em *Arabidopsis thaliana*. C) Cotilédones de *Arabidopsis thaliana* tratados por 4 dias com 10 μ M de bikinina na presença de luz. Os elementos traqueais formados a partir da transdiferenciação de células do mesofilo foram evidenciados pela coloração com floroglucinol.

Em outro artigo recente, um composto denominado XY foi caracterizado como um indutor da diferenciação do xilema em *Arabidopsis thaliana* (Yoshimoto et al., 2016). A XY é um inibidor da biossíntese de termoespermina, uma poliamina caracterizada por inibir a formação do xilema (Fig. 4C). Assim, por um mecanismo semelhante à BK, a XY inibe a produção de um inibidor da diferenciação de elementos traqueais, disparando a formação deste tipo de célula. Além disso, os autores demonstraram que a combinação de XY com 2,4-D apresenta poder sinérgico na indução da diferenciação do xilema, pelo menos em espécies eudicotiledôneas (Yoshimoto et al., 2016). Importante ressaltar que no trabalho original de Yoshimoto et al. (2016), o uso de XY aumentou a taxa de transdiferenciação de elementos traqueais em culturas xilogênicas de *Zinnia elegans*. Dentro desse contexto, a XY foi gentilmente enviada pelo Dr. Hiroyasu Motose (Okayama University), visto que não é um composto comercializado, e utilizada em testes de indução de elementos traqueais nas culturas de *S. viridis*. Primeiramente, realizamos uma análise filogenética para identificar as proteínas ortólogas à ACAULIS5 de *Arabidopsis thaliana* no genoma de *S. viridis*, sendo esta a enzima responsável pela biossíntese de termoespermina e alvo da ação da XY. Foram encontrados dois genes que codificam para ACL5 em *S. viridis* (Fig. 4A), sendo eles expressos no entrenó em desenvolvimento de *S. viridis* (Fig. 4B), o que deu suporte para a realização dos testes de indução com XY. As culturas foram analisadas durante quatro semanas, a partir de alíquotas de 1 mL analisadas em microscopia de luz. No entanto, embora a via de sinalização de ACL5 esteja expressa em entrenós de *S. viridis* (Martin et al., 2016), assim como BK, a XY não foi capaz de induzir a formação de elementos traqueais em culturas de *S. viridis* mesmo utilizando diferentes concentrações hormonais estabelecidas com base em protocolos descritos para *Z. elegans* (Tabela 4) (Fukuda & Komamine, 1980; Fukuda, 1997; Yoshimoto et al., 2016). Essas observações demonstram as dificuldades em extrapolar os dados obtidos em plantas eudicotiledôneas para gramíneas (Tabela 4).

Figura 4. Xilemina é um composto que induz a formação de elementos traqueais pela inibição da biossíntese de termoespermina, uma poliamina que inibe a formação de xilema. A) Análise filogenética por *Maximum Likelihood* de proteínas envolvidas na biossíntese de termoespermina em *Arabidopsis thaliana* e *Setaria viridis*. Proteínas ACL5 caracterizadas em outras espécies vegetais também foram incluídas. Os valores nos ramos representam análise de suporte por Shimodaira-Hasegawa approximate likelihood-ratio test e ultrafast bootstrap, respectivamente. B) Análise de expressão dos genes envolvidos na biossíntese de termoespermina a partir de dados de RNAseq do entrenó de *S. viridis* (dados de Martin et al., 2016) C) Via de biossíntese de termoespermina e a ação da xilemina.

Tabela 4. Combinações hormonais de auxina (2,4-D), citocinina (KIN) e xilemina (XY), utilizadas na indução de elementos traqueais em células de suspensão de *S. viridis*.

Tratamento	1°	2°	3°	4°
	Semana	Semana	Semana	Semana
2,4-D 10 µM + KIN 3 µM + 10 µM XY	-	-	-	-
2,4-D 10 µM + KIN 10 µM + 0 µM XY	-	-	-	-
2,4-D 10 µM + KIN 30 µM + 0 µM XY	-	-	-	-
2,4-D 10 µM + BA 10 µM + 0 µM XY	-	-	-	-

Conclusão: Embora BK e XY tenham sido apontados como compostos que induzem a formação de xilema em *A. thaliana*, em nenhum dos tratamentos foi possível observar a presença de elementos traqueais em suspensões celulares de *S. viridis*. Assim, é provável que o processo de indução de formação de xilema, pela via da BK e da XY em *S. viridis* não seja totalmente conservado como em espécies eudicotiledôneas, ou que estejam sob a ação de outros mecanismos moleculares.

4.3 CONCLUSÃO GERAL

Ao nosso conhecimento, todas as publicações sobre cultura de tecidos em *S. viridis* tinham como foco a obtenção de calos para regeneração de plantas no contexto da transformação genética (Martins et al., 2015). No entanto, o potencial da cultura de tecidos como ferramenta de estudos é enorme, sendo muito mais que um simples passo no processo de produção de plantas geneticamente modificadas. Ela pode ser utilizada no estudo de diversos processos fisiológicos, celulares e moleculares em plantas, sendo um sistema de baixa complexidade celular, fechado e controlado. Dessa forma, nossos trabalhos foram focados na obtenção e estabelecimento da cultura de tecidos em *S. viridis*, desde a obtenção de calos friáveis até o estabelecimento de suspensões celulares, a fim de estabelecer uma ferramenta de estudos em gramíneas C4, com foco em parede celular secundária. As suspensões celulares foram estabelecidas pela adaptação do protocolo de transformação genética de Martins e seus colaboradores (2015). Neste protocolo, embriões maduros são inoculados em meio de cultura, resultando em calos de aparência friável, os quais puderam ser facilmente dissociados, permitindo o estabelecimento das células em suspensão. O meio de cultura das células em suspensão foi o mesmo daquele usado

para a indução dos calos, sem o uso de agente gelificante, o que manteve a boa resposta de crescimento observada para os calos. Ao nosso conhecimento, esta é a primeira vez que uma cultura de células em suspensão de *S. viridis* foi estabelecida. Tal ferramenta pode ser utilizada agora em diversos estudos fisiológicos e moleculares, sendo que neste trabalho tentamos utilizá-la no estabelecimento de culturas xilogênicas para estudos de parede celular secundária.

Elementos traqueais transdiferenciados a partir de células do mesofilo de *Zinnia elegans* foram as primeiras culturas xilogênicas estabelecidas (Fukuda & Komamine, 1980) e foram amplamente utilizadas na caracterização estrutural e molecular do processo de formação do xilema e da deposição de parede celular secundária (Yamamoto et al., 1997; Demura et al., 2002; Gabaldón et al., 2005; Pesquet et al., 2005; Pesquet et al., 2013). Em culturas de *Z. elegans*, o uso de auxina é requisito absoluto na indução da transdiferenciação de elementos traqueais (Miloni et al., 2001) e muitos genes envolvidos na sinalização de auxina são expressos durante este processo (Demura et al., 2002; Milioni et al., 2002). Além da auxina, a citocinina também é requerida, visto que a ação de apenas um dos hormônios não resulta na formação de elementos traqueais (Miloni et al., 2001). Assim, diversos estudos tem demonstrado que hormônios vegetais são fatores importantes na regulação da transdiferenciação de elementos traqueais, em espécies vegetais distintas (Fukuda, 1997; Yamamoto et al., 1997; Ogita et al., 2012). O papel da auxina na diferenciação vascular durante o desenvolvimento normal da planta já foi muito bem documentada (Turner et al., 2007). Em bambu, Ogita e colaboradores (2012) reportaram que a utilização de citocininas e auxinas foram importantes fatores na promoção culturas xilogênicas e estimulou a biossíntese de lignina, resultando na diferenciação de dois tipos celulares: (i) células do tipo fibra (*fiber-like elements*), sendo células alongadas com espessamento homogêneo de parede celular; (ii) elementos traqueais, que apresentavam diferentes padrões de espessamento de parede celular de acordo com a ultraestrutura das perfurações. Importante notar que, além dos reguladores de crescimento auxina e citocinina, os autores evidenciaram que a presença de sacarose também foi um fator relevante na diferenciação dos elementos traqueais nas culturas de bambu. Rogers e colaboradores (2005) evidenciaram que plantas de *A. thaliana* crescidas durante 6 dias no escuro em meio MS suplementado com sacarose apresentavam sinal positivo para floroglucinol, demonstrando a presença de lignina nos feixes vasculares. Por outro lado, plantas crescidas sem a suplementação de

sacarose, mas na presença de outra fonte de carbono, não apresentaram sinal para o floroglucinol. Além disso, as plântulas crescidas no escuro com fornecimento exógeno de sacarose apresentaram desenvolvimento vegetativo avançado, quando comparadas com as plântulas crescidas na ausência de sacarose. Assim, é evidente que a sacarose não atua apenas como fonte de carbono, mas também como um sinalizador no processo de lignificação (Rogers et al., 2005).

Além de auxinas e citocininas, outros hormônios vegetais têm sido utilizados no estabelecimento de culturas xilogênicas, como brassinosteróides. A importância destes hormônios para a diferenciação do xilema foi também estudada em culturas de *Zinnia* (Fukuda, 2004). Durante a transdiferenciação de células do mesofilo em elementos traqueais em *Zinnia*, tratamentos com uniconazol, que é um inibidor da biossíntese de brassinosteróides bloquearam a fase final do processo, inibindo a formação de elementos traqueais. Entretanto, quando essas culturas foram tratadas com brassinolide, o processo de indução de elementos traqueais foi recuperado (Yamamoto et al., 1997). Em suspensões celulares de *switchgrass*, o uso de brassinolide resultou não apenas na diferenciação das células em elementos traqueais como também possibilitou o crescimento da cultura celular (Shen et al., 2013). Nestas células, o conteúdo e composição de lignina foi analisado por tioacidólise e revelou uma significativa indução na deposição deste polímero entre 2-3 dias após o início do tratamento, chegando a aumentar cerca de 15 vezes após 7 dias quando comparado às culturas iniciais. Dessa forma, é evidente que diferentes hormônios contribuem para o estabelecimento de culturas xilogênicas em diferentes espécies vegetais.

Em nossos resultados, o uso de diferentes hormônios no estabelecimento de culturas xilogênicas de *S. viridis* não resultaram na formação de elementos traqueais, independente das concentrações e combinações utilizadas. Muito embora protocolos de culturas xilogênicas tenham sido estabelecidas para espécies filogeneticamente próximas a *S. viridis* como bambu e *switchgrass*, nas condições aqui testadas não foi possível reproduzir este efeito. Dessa forma, é possível que as combinações e/ou concentrações utilizadas não foram ideais para induzir o processo de transdiferenciação de elementos traqueais em *S. viridis*. Finalmente, fica evidente que, o processo de indução de elementos traqueais não segue um protocolo comum a todas as espécies.

Além dos hormônios vegetais, alguns compostos sintéticos foram reportados como indutores da diferenciação do xilema na planta-modelo *A. thaliana*, como BK (Kondo et al., 2015; Kondo & Fukuda, 2015) e XY (Yoshimoto et al., 2016). No entanto a utilização desses compostos não resultou em respostas de diferenciação de elementos traqueais em suspensões celulares de *S. viridis*. Tal observação sugere que os mecanismos moleculares que controlam a diferenciação de células do xilema em espécies eudicotiledôneas não são totalmente conservados em gramíneas, provavelmente devido ao longo tempo de divergência entre as duas linhagens (Li & Brutnell, 2011). Um claro exemplo da divergência em mecanismos moleculares entre eudicotiledôneas e gramíneas é que fatores que regulam positivamente a floração em *A. thaliana* podem inibir a floração em arroz (*Oryza sativa*) (Hayama & Coupland, 2004). Em arroz, os genes *Hd1*, expressos ao final do dia, e *Hd3a* são homólogos ao *CO* e *FT* em *A. thaliana*, respectivamente, os quais atuam no florescimento. Porém, durante o processo de floração em *A. thaliana*, sob condições de dias longos, *CO* atua diretamente induzindo a expressão de *FT* e promovendo florescimento, enquanto no arroz, sob condições de dias longos, o *Hd1* é ativado via fitocromo, inibindo *Hd3a* e consequentemente impedindo a floração (Hayama & Coupland, 2004). Assim, embora homólogos, *Hd1* e *CO* apresentam papéis opostos no controle de *Hd3a* e *FT*, denotando a dificuldade em extrapolar o conhecimento de espécies eudicotiledôneas para gramíneas. Portanto, embora muitos protocolos foram desenvolvidos a partir dos primeiros resultados reportados por Fukuda e Komamine (1980) para *Zinnia elegans*, é evidente que o estabelecimento de culturas xilogênicas é dependente não apenas dos compostos e hormônios utilizados, mas também exige um entendimento do processo de formação do xilema em cada espécie estudada.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Indução de calos de *S. viridis* a partir de embriões maduros

Sementes maduras de *S. viridis* variedade A10 (gentilmente cedidas pelo Prof^o Dr. Carlos Hotta, IQ/USP) tiveram seu tegumento removido e foram esterilizadas com hipoclorito de sódio 10 % por três minutos, seguido de três lavagens com água deionizada estéril em câmara de fluxo laminar e secas em papel filtro estéril. As sementes foram então transferidas para meio de indução contendo sais e vitaminas do meio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 0.5 mg/L ácido nicotínico,

0.5 mg/L piridoxina HCl, 0.1 mg/L tiamina HCl, 30 g/L de sacarose, 100 mg/L de mio-inositol, 0.6 mg/L CuSO₄, 0.5 mg/L de KIN e 2 mg/L de 2,4-D (Martins et al., 2015). As culturas foram mantidas no escuro a 25°C e subcultivadas após 4 semanas.

4.4.2 Estabelecimento de cultura de células em suspensão de *S. viridis*

Cerca de 250 mg de calos friáveis de *S. viridis* foram gentilmente macerados e transferidos para 30 mL de meio líquido contendo os sais e vitaminas do meio MS suplementado com 0.5 mg/L ácido nicotínico, 0.5 mg/L piridoxina HCl, 0.1 mg/L tiamina HCl, 30 g/L de sacarose, 100 mg/L de mio-inositol, 0.6 mg/L CuSO₄, 0.5 mg/L de KIN e 2 mg/L de 2,4-D (Martins et al., 2015). As culturas de células em suspensão foram incubadas em agitadores a 120 rpm, 25 °C no escuro. As subculturas foram realizadas com 21 dias, inicialmente com base nos dados da curva de crescimento. Posteriormente esse tempo foi reduzido para 15 dias a fim de minimizar o processo de oxidação das culturas.

4.4.3 Curva de crescimento das culturas em suspensão de *S. viridis*

Esta análise foi realizada utilizando um sistema no qual um erlenmeyer de 50 mL foi acoplado a um tubo falcon de 15 mL. Nesse sistema, as células em suspensão de *S. viridis* foram filtradas em mesh 60 (0,191 mm de diâmetro da malha) e então 20 mg de células foram gentilmente transferidas para 20 mL meio de cultura, permanecendo sob agitação 120 rpm, 25°C no escuro. A cada dois dias até o fim de 21 dias, as culturas foram analisadas e os valores referentes ao volume de células sedimentadas foram anotados, possibilitando a utilização dos dados na construção da curva de crescimento. A curva de crescimento celular foi construída utilizando-se o volume de células sedimentada presente após a inversão do sistema erlenmeyer – falcon em cada ponto de coleta ao longo dos 21 dias de análise.

4.4.4 Testes de indução de transdiferenciação de elementos traqueais em culturas de suspensão de *S. viridis*

Primeiramente, os testes de indução de transdiferenciação de elementos traqueais nas culturas de *S. viridis* foram realizados seguindo o protocolo estabelecido para bambu (Ogita et al., 2012). As culturas foram filtradas em mesh de 60 (0,191 mm de diâmetro da malha) e posteriormente 300 mg de células foram inoculadas em meio de indução contendo as seguintes concentrações hormonais:

- A. Meio MS controle;
- B. Meio MS + 2,4-D 10 μ M;
- C. Meio MS + 2,4-D 30 μ M;
- D. Meio MS + BA 10 μ M;
- E. Meio MS + BA 30 μ M;
- F. Meio MS + ANA 10 μ M;
- G. Meio MS + ANA 30 μ M;
- H. Meio MS + GA₃ 10 μ M;
- I. Meio MS + GA₃ 30 μ M;
- J. Meio MS + TDZ 10 μ M;
- K. Meio MS + TDZ 30 μ M.

As culturas então permaneceram sob agitação 120 rpm, 25°C sob tratamentos de luz e escuro, tendo uma alíquota retirada para as análises de microscopia de luz a cada 7 dias, até o final de 28 dias após o início da indução das células.

Posteriormente, diferentes concentrações e combinações hormonais foram testadas com base nos protocolos estabelecidos para *switchgrass* contendo BL (Shen et al., 2013) e TDZ (Ogita et al., 2012), de maneira combinada pois resultaram em resposta positiva em culturas de suspensão de cana-de-açúcar (capítulo 3), além de macro e micro nutrientes do meio MS (4.3 g/L) e 30 g/L de sacarose. Desse modo diferentes tratamentos foram utilizados:

- A. 2,4-D 10 μ M + 0 μ M BL;
- B. 2,4-D 10 μ M + 0,2 μ M BL;
- C. 2,4-D 10 μ M + 1 μ M BL;
- D. 2,4-D 10 μ M + 2,5 μ M BL;
- E. 2,4-D 10 μ M + 10 μ M BL;
- F. 2,4-D 0 μ M + 0,2 μ M BL;
- G. 2,4-D 0 μ M + 1 μ M BL;
- H. 2,4-D 0 μ M + 2,5 μ M BL;
- I. 2,4-D 0 μ M + 10 μ M BL;
- J. 2,4-D 10 μ M + TDZ 10 μ M + 0 μ M BL;
- K. 2,4-D 10 μ M + TDZ 10 μ M + 0,2 μ M BL;
- L. 2,4-D 10 μ M + TDZ 10 μ M + 1 μ M BL;
- M. 2,4-D 10 μ M + TDZ 10 μ M + 2,5 μ M BL;
- N. 2,4-D 10 μ M + TDZ 10 μ M + 10 μ M BL;

- O. 2,4-D 0 μM + TDZ 10 μM + 0 μM BL;
- P. 2,4-D 0 μM + TDZ 10 μM + 0,2 μM BL;
- Q. 2,4-D 0 μM + TDZ 10 μM + 1 μM BL;
- R. 2,4-D 0 μM + TDZ 10 μM + 2,5 μM BL;
- S. 2,4-D 10 μM + TDZ 10 μM + 10 μM BL.

As culturas de células em suspensão de *S. viridis* foram ainda submetidas a tratamento contendo BK com algumas modificações do protocolo de indução ectópica estabelecido para *Arabidopsis thaliana* (Kondo et al., 2015). Assim, 300 mg de células filtradas em mesh 60 (0,191 mm de diâmetro da malha) foram transferidas para os meios de indução contendo macro e micro nutrientes do meio MS (4.3 g/L), 30 g/L de sacarose, 2 mg/L de 2,4-D, suplementado com 0.5 mg/L ácido nicotínico, 0.5 mg/L piridoxina HCl, 0.1 mg/L tiamina HCl, 100 mg/L de mio-inositol, 0.6 mg/L CuSO_4 , 0.5 mg/L de KIN (Martins et al., 2015). Os tratamentos contendo BK consistiu das seguintes combinações:

- A. Meio padrão controle de *S. viridis* (Martins et al., 2015) contendo 100 μL de DMSO;
- B. Meio padrão + 10 μM de BK (dissolvida em DMSO);
- C. Meio padrão + 20 μM de BK (dissolvida em DMSO).

As culturas permaneceram sob agitação 120 rpm, 25°C na luz e no escuro, tendo uma alíquota analisada a cada 7 dias através de microscopia de luz.

Adicionalmente, a XY, um inibidor da biossíntese de termoespermina, foi utilizada em testes de indução. Os dados reportados por Yoshimoto e seus colaboradores (2016) indicam que o uso combinado de XY e auxina sintética apresentam efeito sinérgico sobre a diferenciação do xilema. Assim, diferentes combinações foram utilizadas a fim de testar a indução da transdiferenciação das suspensões celulares em elementos traqueais:

- A. 2,4-D 10 μM + KIN 3 μM + XY 10 μM ;
- B. 2,4-D 10 μM + KIN 10 μM + XY 10 μM ;
- C. 2,4-D 10 μM + KIN 30 μM + XY 10 μM ;
- D. 2,4-D 10 μM + BA 10 μM + XY 10 μM ;

As culturas permaneceram sob agitação 120 rpm, 25°C no escuro, tendo uma alíquota analisada a cada 7 dias através de microscopia de luz.

Um quarto experimento foi realizado, o qual tinha como objetivo testar a capacidade de diferentes tipos de concentrações de hormônios vegetais

(principalmente citocininas) no processo de indução de transdiferenciação de elementos traqueais, utilizando modificações baseadas nos protocolos de bambu (Ogita et al., 2012) e switchgrass (Shen et al., 2013). Os tratamentos utilizados foram:

- A. 2,4-D 10 μ M + BA 10 μ M + BL 0 μ M;
- B. 2,4-D 10 μ M + BA 10 μ M + BL 0,2 μ M;
- C. 2,4-D 10 μ M + BA 10 μ M + BL 2,5 μ M;
- D. 2,4-D 10 μ M + BA 10 μ M + BL 10 μ M;
- E. 2,4-D 10 μ M + KIN 10 μ M + BL 0 μ M;
- F. 2,4-D 10 μ M + KIN 10 μ M + BL 0,2 μ M;
- G. 2,4-D 10 μ M + KIN 10 μ M + BL 2,5 μ M;
- H. 2,4-D 10 μ M + KIN 10 μ M + BL 10 μ M;
- I. 2,4-D 10 μ M + KIN 30 μ M + BL 0 μ M;
- J. 2,4-D 10 μ M + KIN 30 μ M + BL 0,2 μ M;
- K. 2,4-D 10 μ M + KIN 30 μ M + BL 2,5 μ M;
- L. 2,4-D 10 μ M + KIN 30 μ M + BL 10 μ M;
- M. 2,4-D 3 μ M + KIN 30 μ M + BL 0 μ M;
- N. 2,4-D 3 μ M + KIN 30 μ M + BL 0 μ M;
- O. 2,4-D 3 μ M + KIN 30 μ M + BL 0,2 μ M;
- P. 2,4-D 3 μ M + KIN 30 μ M + BL 2,5 μ M;
- Q. 2,4-D 3 μ M + KIN 30 μ M + BL 10 μ M.

As culturas de indução de elementos traqueais permaneceram sob agitação 120 rpm, 25°C no escuro, tendo uma alíquota analisada a cada 7 dias através de microscopia de luz.

4.4.5 Identificação e análise filogenéticas de genes ortólogos envolvidos na sinalização de Xilemina e Bixinina em *S. viridis*.

Inicialmente, realizamos uma análise filogenética para identificar as putativas proteínas ortólogas a ACAULIS5 de *A. thaliana* no genoma de *S. viridis*. Em *Arabidopsis*, esta enzima foi identificada como responsável pela biossíntese de termoespermina sendo, portanto, o alvo da ação da XY. Para identificar as putativas proteínas ortólogas a ACAULIS5, sua sequência proteica foi utilizada na função Protein Homologs do Phytozome (v10; <http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). Esta função permite identificar uma lista de proteínas homólogas por meio de scores resultantes de alinhamentos dual-affine Smith-Watermann entre a proteína-isca e

todas as outras proteínas presentes no Phytozome. Além de ACAULIS5 de *Arabidopsis*, sequências de proteínas ortólogas de *Populus trichocarpas*, *Oryza sativa* e *Gosstpium hirrsutum* foram utilizadas nas análises filogenéticas. O mesmo procedimento foi realizado para proteínas homólogas às proteínas GSK3 de *A. thaliana*, envolvidas na sinalização para desenvolvimento vascular inibida por BK, incluindo sequências proteicas de *S. italica* e *Oryza sativa*. As árvores filogenéticas foram construídas através do alinhamento das sequências proteicas de cada família gênica utilizando a plataforma MAFFT (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). Posteriormente, os alinhamentos foram utilizados como *input* na plataforma IQTree (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at>) para a construção das árvores, confirmando as relações evolutivas através do método de Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood*), com *Ultrafast Bootstrap* e Shimodaira-Hasegawa approximate likelihood-ratio test de 1000 repetições.

4.4.6 Análise de dataset de RNAseq publicado de *S. viridis* (Martin et al., 2016)

Recentemente Martin e colaboradores (2015) reportaram a utilização do entrenó em desenvolvimento de *S. viridis* como uma importante ferramenta na descoberta de novos genes. As análises do entrenó revelaram que este poderia ser dividido em quatro diferentes zonas, ordenados da base para o ápice com base no tamanho das células e densidade dos núcleos: (i) zona meristemática; (ii) zona de expansão celular; (iii) zona de transição e (iv) zona de maturação. Análises de metabólitos e expressão gênica também foram realizadas em cada uma das diferentes zonas, assim como o conteúdo de lignina, indicando a presença de parede celular secundária. Foi observado um gradiente de deposição de parede celular secundária ao longo das diferentes zonas do entrenó em processo de alongamento. As análises de expressão permitiram evidenciar clusters gênicos regulados positivamente ou negativamente nas diferentes zonas, revelando alta expressão de genes relacionados à biossíntese de parede celular e metabolismo de lignina na zona de transição e maturação. Assim, o dataset de Martin e colaboradores (2015) foi analisado para verificar se os putativos genes identificados nas análises filogenéticas acima descritas apresentam um padrão de expressão que condiz com genes que apresentam função no desenvolvimento vascular.

4.4.7 Indução de elementos traqueais ectópicos em cotilédones de *A. thaliana*

Kondo e colaboradores (2015) reportaram o desenvolvimento de um método simples para indução da transdiferenciação de células do mesófilo em elementos traqueais utilizando discos foliares e cotilédones de *Arabidopsis*. Assim, plantas de *Arabidopsis* foram cultivadas *in vitro* até o aparecimento dos cotilédones e das primeiras folhas. Neste ponto os cotilédones foram removidos com o auxílio de uma tesoura de ponta fina e incubados em meio de cultura MS meia força, suplementado com 10 g/L de sacarose, 2,5 g/L de 2,4-D, 0,5 g/L de cinetina e 10 mM de BK, permanecendo sob condição de luz a 22 °C durante 4 dias. Após este período, os cotilédones foram incubados em etanol 70 % durante 5 minutos, promovendo a sua diafanização, e em seguida foram corados com floroglucinol (Nakano & Meshitsuka, 1992) e observados em microscópio de luz.

5 **CAPÍTULO 3** – Estabelecimento de culturas xilogênicas e de um sistema de protoplastos para ensaios de expressão transiente em cana-de-açúcar.

5.1 **INTRODUÇÃO**

Cana-de-açúcar é uma gramínea perene do gênero *Saccharum* e que pertence à família Poaceae, a qual contempla grande parte das culturas de interesse econômico. A cana-de-açúcar se desenvolve em forma de touceira, apresentando folhas com bainha, colar, lâmina foliar, e que estão inseridas no colmo de maneira alternada. As flores são pequenas e formam espigas florais agrupadas em uma panícula (Hugot, 1986). Existem diversas variedades cultivadas, as quais diferem na cor e pela altura do colmo, e são multiplicadas desde a antiguidade pelo sistema de estaquia (Leme & Borges, 1985). A parte aérea é formada por colmos compostos por uma série de entrenós, que acumulam grandes quantidades de sacarose. O colmo consiste de entrenós em diferentes estádios de desenvolvimento, em que os entrenós mais jovens encontram-se mais próximos à porção apical (Casu et al., 2007). Estes alongam-se rapidamente e apresentam parede celular primária composta principalmente por celulose, hemicelulose e pectinas, sendo flexíveis, mas ao mesmo tempo mecanicamente estáveis (Jacobsen et al., 1992; Casu et al., 2007). Por outro lado, os entrenós mais velhos apresentam crescimento completo e acúmulo de sacarose, apresentando células com deposição de parede celular secundária, conferindo estabilidade mecânica adicional a determinados tipos celulares, como células do esclerênquima e do xilema (Casu et al., 2007). Estes tipos celulares apresentam parede celular constituída por celulose, hemicelulose e lignina (Reiter, 2002).

A incidência de doenças em cana-de-açúcar, acoplada à necessidade de amplificar características desejáveis, conduziram para o melhoramento genético através de cruzamentos entre *S. officinarum* com as demais espécies do gênero *Saccharum* (Leme & Borges, 1985; Vettore et al., 2003), resultando em cultivares com elevado grau de poliploidia e variação no número de cromossomos (Grivet & Arruda, 2002). As plantas atualmente cultivadas são híbridos derivados principalmente do cruzamento de *S. officinarum* ($2n=80$), que apresenta colmos espessos, elevado teor de sacarose e baixo teor de fibras, com *S. spontaneum* ($2n=40-128$) (Paterson et al., 2013). *S. spontaneum* por sua vez, forneceu características agrônômicas importantes, como aumento do perfilhamento e resistência a determinadas doenças e ao estresse

hídrico (Spencer & Meade, 1967; Ricaud et al., 1989; Dillon et al., 2007; Figueiredo et al., 2016). O genoma das variedades modernas é composto por cerca de 70-80% de cromossomos derivados de *S. officinarum*, 10-20% de *S. spontaneum* e os restantes são resultantes de recombinações entre cromossomos das duas espécies parentais (D'Hont et al., 1996; Piperidis et al., 2010).

A cana-de-açúcar é uma planta de clima tropical, de forma que fatores como temperatura e umidade afetam diretamente seu desenvolvimento (Cheavegatti-Gianotto et al., 2011). A espécie tem destaque no âmbito econômico, pois apresenta alta produção de biomassa e acúmulo de sacarose no colmo e fibras em um curto período de tempo (Lima et al., 2001). É considerada uma das plantas com maior eficiência fotossintética, devido a presença de fotossíntese C4, além de apresentar baixo custo de produção e industrialização (Clarke & Godshall, 1988; Lima et al., 2001). Inicialmente a industrialização da cana-de-açúcar estava baseada na produção e obtenção do açúcar (Ayarza & Cortez, 2007). Contudo, da colheita até o seu processamento na indústria, muitos produtos e subprodutos podem ser obtidos, como o melaço e o bagaço (Ayarza & Cortez, 2007). A cana-de-açúcar é responsável pela produção de cerca de 70% do açúcar produzido mundialmente (Piperidis et al., 2010), sendo este o seu principal produto utilizado na alimentação (Ayarza & Cortez, 2007). O maior produtor mundial de açúcar é o Brasil, sendo responsável por cerca de 33% da produção mundial, seguido da Índia com 22,3% (Tammisola, 2010). Entre os principais consumidores, destacam-se Índia, União Européia, China, Brasil, Estados Unidos e Rússia, que juntos representam em média 52% do consumo mundial de açúcar (Ayarza & Cortez, 2007). O melaço é um sub-produto final da produção do açúcar, comercializado *in natura*, e retêm quase 25% da sacarose produzida na cana-de-açúcar (Otero, 2001). Este pode ter como principal destino a produção de álcool industrial e de bebidas (Ayarza & Cortez, 2007).

O açúcar acumulado no colmo, além de ter ampla utilização comercial, é também matéria-prima para a produção do bioetanol de primeira geração, que se caracteriza como uma fonte de energia renovável e menos poluente. Durante a extração da sacarose, o bagaço é o principal produto residual e é majoritariamente composto por celulose, hemicelulose e lignina (Pandey et al., 2000). Assim, o bagaço tem ganhado destaque como potencial matéria-prima lignocelulósica na produção comercial do etanol de segunda geração (Abramson et al., 2013). A vantagem do bagaço em relação a outras potenciais matérias-primas é sua grande disponibilidade,

visto que a cana-de-açúcar está entre as espécies com maior eficiência na produção de biomassa (Vermerris, 2011b). Atualmente o bagaço tem sido utilizado na produção de calor e energia elétrica durante o processamento do açúcar em bioetanol de primeira geração (Carroll & Somerville, 2009), podendo também ser utilizado como forragem animal em países como Brasil, onde cerca de 10% da produção está destinada a alimentação animal (Tammisola, 2010). Contudo, torna-se cada vez mais interessante o uso de bagaço para a produção de biocombustíveis, visto que a produção de etanol de segunda geração poderia ser acoplada à produção de etanol de primeira geração, compartilhando parte da infraestrutura e otimizando os rendimentos na produção total de bioetanol (Rabelo et al., 2011; Dias et al., 2012). Dessa forma, a cana-de-açúcar se apresenta como uma importante gramínea C4 tanto na produção de açúcar como na produção de bioetanol de primeira e segunda geração e outros derivados.

A utilização do bagaço para a produção de bioetanol de segunda geração requer um conhecimento aprofundado acerca das características bioquímicas e moleculares da parede celular, que é o principal componente desta matéria-prima. Informações genéticas sobre a biossíntese de lignina em cana-de-açúcar são escassas e limitadas a poucos estudos, frequentemente ligados ao perfil de expressão de genes da via dos fenilpropanóides durante o desenvolvimento do colmo ou em relação ao acúmulo de sacarose (Casu et al., 2007; Papini-Terzi et al., 2009). Dados recentes apontam que a supressão do gene *COMT* em cana-de-açúcar resultou na redução do teor de lignina em até 14%, ocasionando um aumento de 29% no rendimento da sacarificação (Jung et al., 2012). Outros dados apontam o papel de um gene de lacase (*SofLAC*) na biossíntese de lignina em cana-de-açúcar, através de análises de co-expressão, análises de expressão tecido-específica e complementação do mutante *lac17* de *Arabidopsis thaliana* (Cesarino et al., 2013). Ainda assim, existe uma grande lacuna no conhecimento acerca da deposição de parede celular secundária e lignina em cana-de-açúcar. Assim, neste capítulo o objetivo do trabalho foi estabelecer uma cultura de células em suspensão de cana-de-açúcar para o subsequente estabelecimento de duas ferramentas para o estudo de parede celular secundária: i) culturas xilogênicas, e ii) um sistema de protoplastos para ensaios de expressão transiente. Tais ferramentas tem grande potencial para ampliar o conhecimento acerca da deposição de parede secundária em gramíneas C4.

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2.1 *Estabelecimento de calos friáveis e células em suspensão de cana-de-açúcar*

O protocolo para estabelecimento das culturas de células em suspensão de cana-de-açúcar foi baseado em dados anteriores do Laboratório BioCel, liderado pela Prof^a. Eny Floh, onde este trabalho foi desenvolvido. Os calos de cana-de-açúcar, variedade SP-803280, foram estabelecidos a partir de explantes de palmito em meio contendo sais e vitaminas do meio MS suplementado com 30 g/L de sacarose e 1 mg/L de 2,4-D (Macedo & Silveira, 2010). Subsequentemente, as culturas de células em suspensão de cana-de-açúcar foram estabelecidas a partir de calos friáveis e não embriogênicos (Fig. 1A, B). Análises microscópicas revelaram que a cultura apresentava células diminutas e dispersas no meio de cultura, mas também com diferentes morfologias celulares, denotando caráter heterogêneo (Fig. 1C). As suspensões celulares apresentaram crescimento equilibrado e sem oxidação, sendo a subcultura realizada a cada 21 dias.

Experimentos de curva de crescimento celular (Fig. 1D) fornecem bons indicativos sobre a taxa de crescimento da cultura, possibilitando assim evidenciar as diferentes fases do processo. Para tal análise, foram inoculados 20 mg de células filtradas a partir das culturas de suspensão em 20 mL de meio de crescimento, que permaneceram sob agitação 120 rpm, 25°C no escuro, tendo seus crescimentos analisados a cada 2 dias, até o fim do ciclo de 21 dias. As culturas de suspensão apresentaram um padrão esperado para uma curva de crescimento celular: (i) fase de latência (fase Lag) que é uma fase relativamente curta em que não ocorre crescimento acentuado; (ii) fase exponencial, em que ocorre crescimento acentuado da cultura, seguido por uma (iii) fase de desaceleração de crescimento celular; e por fim (iv) a fase estacionária, que é caracterizada pela ausência de crescimento (Fig. 1D). As curvas de crescimento nos permitiram analisar a aptidão das culturas, de forma que estas se mostraram bem estabelecidas e aptas para serem utilizadas nos testes de indução de diferenciação dos elementos traqueais.

Figura 1. Estabelecimento de cultura de tecidos em cana-de-açúcar: (A) calos induzidos a partir de palmito, (B) cultura de células em suspensão obtidas a partir dos calos friáveis, (C) morfologia das células na cultura de suspensão e (D) curva de crescimento da cultura de suspensão.

Conclusão. Calos friáveis e cultura de células em suspensão foram eficientemente estabelecidos a partir do palmito de cana-de-açúcar. As culturas apresentaram caráter heterogêneo, com células diminutas e dispersas no meio de cultura e com diferentes morfologias celulares. A curva de crescimento estabeleceu um ciclo de 21 dias para repicagem, e forneceu subsídios para a utilização da cultura nos ensaios de indução de diferenciação de elementos traqueais.

5.2.2 Teste de indução de transdiferenciação de elementos traqueais nas culturas de suspensão de cana-de-açúcar, com base no protocolo estabelecido para bambu (Ogita et al., 2012)

Muitos trabalhos relatam que o processo de transdiferenciação de elementos traqueais pode ser influenciado pelas condições de cultivo, incluindo os hormônios utilizados e suas concentrações (Devillard & Walter, 2014). A taxa de diferenciação dos elementos traqueais está passível de variação entre genótipos de uma mesma espécie e entre diferentes espécies, dependendo do método utilizado (Devillard & Walter, 2014). Dessa forma, inicialmente foi utilizado o protocolo estabelecido em bambu (Ogita et al., 2012), devido à proximidade filogenética, para os testes de indução de transdiferenciação de elementos traqueais em culturas de suspensão de cana-de-açúcar. As culturas foram filtradas e 300 mg de células foram inoculadas em 30 mL de meios de indução distintos, diferindo na composição e concentração de hormônios, como evidenciado na Tabela 1. Os meios foram suplementados com sacarose, visto que este composto é não somente uma fonte de carbono, mas também um sinalizador no processo de lignificação (Rogers et al., 2005; Ogita et al., 2012). Todos os tratamentos foram submetidos a condições de luz e escuro, no intuito de analisar respostas distintas. A opção de exposição à luz foi considerada visto que no protocolo estabelecido com BK para *Arabidopsis* (Kondo et al., 2015), a presença de luz foi fundamental para a indução da formação de elementos traqueais. Alíquotas retiradas semanalmente dos 20 tratamentos foram analisadas em microscopia de luz e revelaram que apenas os tratamentos contendo a citocinina TDZ (10 μ M) apresentavam formação de elementos traqueais, tanto na presença quanto na ausência de luz (Fig. 2), a partir de duas semanas de tratamento. Neste caso, a presença de luz não demonstrou ser um fator relevante na diferenciação de elementos traqueais em cana-de-açúcar como observado no sistema de discos foliares de *Arabidopsis*, visto que a transdiferenciação ocorreu mesmo na ausência de luz. Os elementos traqueais induzidos apresentaram padrão de espessamento da parede celular do tipo reticulado (Fig. 2), sendo um padrão também encontrado em análises *in vivo* realizadas a partir da dissociação de tecidos do entrenó de cana (Fig. 7) (Franklin, 1945).

Figura 2. Microscopia de luz das culturas de cana-de-açúcar em meio MS suplementado com 10 µM de TDZ sob condição de escuro (A) e luz (B), ambos demonstrando a presença de elementos traqueais indicados pela seta.

Todos os demais tratamentos não apresentaram formação elementos traqueais (Tabela 1). Contudo, após três semanas de tratamento, as culturas contendo TDZ apresentaram oxidação das células, que pode ser decorrente de algum estresse produzido durante o processo de transdiferenciação, ou da presença do próprio hormônio, visto que tal evento também foi observado nas culturas induzidas de *S. viridis*.

Tabela 1. Tratamentos utilizados para indução de transdiferenciação de elementos traqueais em culturas de cana-de-açúcar, de acordo com o protocolo estabelecido para bambu (Ogita et al.,2012). O sinal positivo (+) indica a presença e o sinal negativo (-) indica a ausência de elementos traqueais.

Tratamento		1° Semana	2° Semana	3° Semana	4° Semana
Luz	2,4-D 10 µM	-	-	-	-
	2,4- D 30 µM	-	-	-	-
	BA 10 µM	-	-	-	-
	BA 30 µM	-	-	-	-
	ANA 10 µM	-	-	-	-
	ANA 30 µM	-	-	-	-
	GA ₃ 10 µM	-	-	-	-
	GA ₃ 30 µM	-	-	-	-
	TDZ 10 µM	-	+	+	+

Escuro	TDZ 30 μ M	-	-	-	-
	2,4-D 10 μ M	-	-	-	-
	2,4- D 30 μ M	-	-	-	-
	BA 10 μ M	-	-	-	-
	BA 30 μ M	-	-	-	-
	ANA 10 μ M	-	-	-	-
	ANA 30 μ M	-	-	-	-
	GA ₃ 10 μ M	-	-	-	-
	GA ₃ 30 μ M	-	-	-	-
	TDZ 10 μ M	-	+	+	+
	TDZ 30 μ M	-	-	-	-

Conclusão: Diferentemente dos dados reportados por Ogita e colaboradores (2012), no qual o hormônio BA foi o que apresentou melhor resposta no processo de indução de diferenciação de elementos traqueais, as culturas de cana-de-açúcar não responderam de maneira positiva a este hormônio. O tratamento com a citocinina TDZ na concentração de 10 μ M foi o único que resultou na indução do processo de transdiferenciação de elementos traqueais. Os elementos traqueais formados apresentaram padrão reticulado de deposição de parede celular. Entretanto, devido a intensa oxidação ocasionada pela presença do hormônio TDZ, outros protocolos que permitissem a manutenção e viabilidade da cultura foram testados.

5.2.3 Teste de indução de transdiferenciação de elementos traqueais nas culturas de suspensão de cana-de-açúcar, com base no protocolo estabelecido para *switchgrass* (Shen et al., 2013)

O protocolo estabelecido por Shen e seus colaboradores (2013) para *switchgrass* foi posteriormente utilizado para o delineamento experimental da indução da cultura de suspensão de cana-de-açúcar. Assim, uma série de combinações hormonais envolvendo 2,4-D e brassinolide (BL) foram testadas como descrito na tabela 2. Ademais, devido aos resultados positivos encontrados nos experimentos anteriores, a citocinina TDZ também foi utilizada nas combinações hormonais.

Tabela 2. Tratamentos utilizados para indução de transdiferenciação de elementos traqueais em culturas de cana-de-açúcar, de acordo com o protocolo estabelecido para *switchgrass* (Shen et al., 2013). O sinal positivo (+) indica a presença e o sinal negativo (-) indica a ausência de elementos traqueais.

Tratamento	1° Semana	2° Semana	3° Semana	4° Semana
2,4-D 10 µM + 0 µM BL	-	-	-	-
2,4- D 10 µM + 0,2 µM BL	+	+	+	+
2,4- D 10 µM + 1 µM BL	+	+	+	+
2,4-D 10 µM + 2,5 µM BL	+	+	+	+
2,4- D 10 µM + 10 µM BL	+	+	+	+
2,4- D 0 µM + 0,2 µM BL	-	-	-	-
2,4- D 0 µM + 1 µM BL	-	-	-	-
2,4- D 0 µM + 2,5 µM BL	-	-	-	-
2,4- D 0 µM + 10 µM BL	-	-	-	-
2,4- D 10 µM+ TDZ 10 µM + 0 µM BL	+	+	+	+
2,4- D 10 µM + TDZ 10 µM + 0,2 µM BL	+	+	+	+
2,4- D 10 µM + TDZ 10 µM + 1 µM BL	+	+	+	+
2,4- D 10 µM + TDZ 10 µM + 2,5 µM BL	+	+	+	+
2,4- D 10 µM + TDZ 10 µM + 10 µM BL	+	+	+	+
2,4-D 0 µM + TDZ 10 µM + 0 µM BL	-	-	-	-
2,4-D 0 µM + TDZ 10 µM + 0,2 µM BL	+	+	+	+
2,4-D 0 µM + TDZ 10 µM + 1 µM BL	+	+	+	+
2,4-D 0 µM + TDZ 10 µM + 2,5 µM BL	+	+	+	+
2,4-D 0 µM + TDZ 10 µM + 10 µM BL	+	+	+	+

Foi observado durante o experimento que a formação de elementos traqueais só ocorria na presença de ao menos dois tipos de hormônios vegetais combinados, sendo eles (i) 2,4-D e BL, (ii) 2,4-D e TDZ e (iii) TDZ e BL (Fig. 3), de forma que meios de indução contendo um único hormônio não foram efetivos, independente da concentração utilizada. Em culturas xilogênicas de *Zinnia elegans*, foi determinado que tanto a presença de auxina quanto de citocinina seria essencial para induzir a diferenciação de elementos traqueais, de forma que a aplicação isolada destes hormônios não foi suficiente (Miloni et al., 2001). Embora não tenha sido possível quantificar a taxa de transdiferenciação devido a presença de numerosos *clusters* celulares, os tratamentos com dois tipos de hormônios resultaram em uma maior frequência de visualização de elementos traqueais quando comparados aos dados reportados no item 5.2.2 utilizando apenas TDZ. Os elementos traqueais encontrados nos tratamentos indicados (Tabela 2) em cana-de-açúcar apresentaram padrão de deposição reticulado ou pontoadado e diferiam no formato e tamanho. As análises

microscópicas revelaram que as culturas de suspensão formam diminutos calos e que a visualização de elementos traqueais se deu predominantemente nas regiões de “borda” dos pequenos calos e raras vezes como células isoladas (Fig. 3). Outros trabalhos também relataram a formação de elementos traqueais internamente ou no entorno de grandes associações celulares (Fukuda, 1992; Oda et al., 2005). Esses dados são condizentes com os trabalhos de Motose e colaboradores (2004), os quais revelaram que a comunicação intercelular está intimamente envolvida na diferenciação dos elementos traqueais através de uma proteína denominada *xylogen*, sendo emitida pelas células em diferenciação (Motose et al., 2004). Dessa forma, é possível que a comunicação entre as células favoreça o desenvolvimento dos elementos traqueais, de forma que estes tornam-se mais visíveis no entorno de pequenos calos. Contudo, também é plausível que a superfície de contato das células encontradas no interior destes pequenos calos com os hormônios vegetais seja reduzida, resultando em uma menor eficiência da ação hormonal quando comparada a células isoladas, e permitindo que apenas células que estão no entorno desses pequenos calos se diferenciem em elementos traqueais.

Após 2 semanas de indução, foi observado que os tratamentos contendo TDZ passaram a apresentar oxidação das células. As grandes associações celulares se mostraram cada vez mais densas e mais oxidadas, dificultando a identificação dos elementos traqueais por microscopia de luz. Dentre os tratamentos utilizados, o que melhor preservou a integridade das culturas celulares, demonstrando ausência de oxidação e presença de elementos traqueais, foram os tratamentos contendo 2,4-D 10 μ M + BL (0,2 μ M, 1 μ M, 2,5 μ M e 10 μ M). Oda e colaboradores (2005) evidenciaram que a taxa de diferenciação dos elementos traqueais em suspensões celulares de *A. thaliana* tornou-se crescente com o aumento da concentração de BL maiores que 1 μ M, mas que apresentavam uma tendência oposta para 2,4-D, denotando um efeito inibidor com o aumento da concentração. Em nossos resultados, embora não tenha sido possível quantificar a taxa de diferenciação dos elementos traqueais devido a presença de grandes associações celulares, elevadas concentrações de BL resultaram no aumento da transdiferenciação. Contudo, a taxa de crescimento celular diminuiu quando a concentração de 10 μ M de BL foi utilizada.

Figura 3. Microscopia de luz das culturas induzidas de cana-de-açúcar. Os tratamentos utilizados foram segundo protocolo estabelecido em switchgrass (Shen et al.,2013), com pequenas modificações. Os elementos traqueais estão indicados pelas setas vermelhas. Os tratamentos mostrados são: (A) 2,4- D 10 μ M + 0,2 μ M BL, (B) 2,4- D 10 μ M + 1 μ M BL, (C) 2,4-D 10 μ M + 2,5 μ M BL, (D) 2,4- D 10 μ M + 10 μ M BL, (E) 2,4- D 10 μ M+ TDZ 10 μ M + 0 μ M BL, (F) 2,4- D 10 μ M + TDZ 10 μ M + 0,2 μ M BL, (G) 2,4- D 10 μ M + TDZ 10 μ M + 1 μ M BL, (H) 2,4- D 10 μ M + TDZ 10 μ M + 2,5 μ M BL, (I) 2,4- D 10 μ M + TDZ 10 μ M + 10 μ M BL, (J) 2,4-D 0 μ M + TDZ 10 μ M + 0,2 μ M BL, (K) 2,4-D 0 μ M + TDZ 10 μ M + 1 μ M BL, (L) 2,4-D 0 μ M + TDZ 10 μ M + 2,5 μ M BL, (M) 2,4-D 0 μ M + TDZ 10 μ M + 10 μ M BL.

Figura 3. Continuação

Urge ressaltar os diversos métodos que foram testados para melhor evidenciar/contrastar a presença de elementos traqueais que se formavam majoritariamente no entorno das grandes associações celulares. Primeiramente, utilizamos floroglucinol para corar células cujas paredes apresentassem deposição de lignina, que é o caso dos elementos traqueais. No entanto, provavelmente pelos baixos níveis de lignina encontrada em células isoladas, não foi possível observar coloração. Posteriormente, utilizamos microscopia de fluorescência, visto que compostos fenólicos como lignina apresentam autofluorescência, o que poderia ser utilizado para discriminar células específicas nos agregados celulares. Contudo, a parede celular primária de gramíneas apresenta, como característica marcante, uma alta proporção relativa de hidroxicinamatos (Vogel, 2008) que também emitem fluorescência quando excitados. Desse modo, todas as células da cultura apresentaram significativa fluorescência nas análises, o que impossibilitou a identificação de elementos traqueais dentre as demais células. Assim, a presença de grandes associações celulares, a ausência de coloração com o floroglucinol e autofluorescência presente na parede celular de gramíneas impossibilitaram a quantificação precisa dos elementos traqueais.

Por fim, no intuito de visualizar com maior precisão quais foram os padrões de deposição de parede secundária nos elementos traqueais formados no processo de indução, utilizamos microscopia confocal (Fig. 4). As análises revelaram dois padrões distintos de deposição de parede celular secundária: reticulado (Fig. 4 A, B) e pontado (Fig. 4 C, D), os quais são caracterizados pelo depósito de parede celular a partir do metaxilema e caracteriza um dos estágios finais de deposição de parede celular secundária (Taiz & Zeiger, 2006). Tais padrões de deposição de parede celular secundária também foram observados nas análises *in vivo* após dissociação dos tecidos do colmo de cana-de-açúcar (Fig. 7). Outros trabalhos de indução de elementos traqueais também reportam a presença de tais padrões de deposição de parede celular (Oda et al., 2005; Twumasi et al., 2010; Negi et al., 2015). Tais observações sugerem que a combinação hormonal utilizada na indução da transdiferenciação de elementos traqueais em células de cana-de-açúcar foi capaz de mimetizar, ao menos em parte, o processo que ocorre naturalmente durante a formação do sistema vascular na planta.

Figura 4. Microscopia confocal das culturas induzidas de cana-de-açúcar, utilizando o tratamento contendo 2,4-D 10 μ M + BL 2,5 μ M. (A) elementos traqueais formados no entorno do *cluster* celular, apresentando padrão de espessamento reticulado; (B) elementos traqueais induzidos apresentando padrão de espessamento reticulado; (C) e (D) elementos traqueais com espessamento de pontoado de parede celular secundária.

Conclusão: O experimento de indução utilizando uma adaptação do protocolo estabelecido para *switchgrass* (Shen et al., 2013) mostrou-se eficiente na indução de elementos traqueais em culturas de suspensão de cana-de-açúcar. Ficou evidente que ao menos dois hormônios vegetais são necessários para que ocorra formação de elementos traqueais, dentre auxinas, citocininas e brassinosteróides. A presença de brassinolide foi o principal fator identificado capaz de induzir a formação destes tipos celulares e ainda manter a integridade das culturas, diferentemente de TDZ que gerou significativa oxidação. A microscopia confocal possibilitou visualizar de maneira precisa o padrão de espessamento encontrado nos elementos traqueais formados: i) padrão reticulado e ii) padrão pontoado. Estes dados sugerem que o melhor tratamento para indução de elementos traqueais nas culturas de cana foi aquele

contendo 2,4-D 10 μ M + BL 2,5 μ M, de forma que este então foi o tratamento utilizado em experimentos subsequentes de caracterização do sistema.

5.2.4 Testes de indução de transdiferenciação de elementos traqueais nas culturas de suspensão de cana-de-açúcar, utilizando diferentes compostos que induzem a formação de xilema em eudicotiledôneas

O uso de diferentes hormônios e compostos sintéticos já foram descritos para diversas espécies como capazes de desencadear o processo de formação de elementos traqueais (Fukuda, 1992; Yamamoto et al., 1997; Ogita et al., 2012; Shen et al., 2013; Kondo et al., 2015; Yoshimoto et al., 2016). Como mencionado no item 4.2.5 do capítulo 2, recentemente dois compostos sintéticos foram identificados como indutores da formação de xilema na planta-modelo *Arabidopsis thaliana* (Kondo et al., 2015; Yoshimoto et al., 2016). A BK é um inibidor de proteínas GSK3 envolvidas na inibição da diferenciação do xilema (Fig. 5B). Assim, a inibição de GSK3 pela BK permite a ação do fator de transcrição BES1 que então induz a formação do xilema. Primeiramente, procuramos por genes ortólogos a GSK3s de *Arabidopsis* no banco dados de sequências de nucleotídeos de cana-de-açúcar no SUCEST (<http://sucest-fun.org>) e encontramos ao menos uma cópia de cada membro, para todos os subclados dentro da família gênica (Fig. 5A). Dessa forma, foi concluído que os potenciais alvos da ação da BK estão presentes em cana-de-açúcar. Posteriormente o protocolo desenvolvido por Kondo e colaboradores foi testado sob nossas condições em cotilédones de *A. thaliana*, e de fato a BK foi capaz de induzir a transdiferenciação de células do mesofilo em elementos traqueais após 4 dias de tratamento (Fig. 5C). Então, testou-se o potencial efeito da BK sobre a diferenciação de elementos traqueais em culturas de suspensão de cana-de-açúcar, utilizando duas concentrações: 10 μ M (a mesma concentração utilizada nos ensaios com discos foliares de *Arabidopsis*; Kondo et al. 2015) e 20 μ M (caso o efeito da BK fosse menor em gramíneas). Contudo, não houve formação de elementos traqueais nas suspensões celulares de cana-de-açúcar, em nenhum dos tratamentos (dados não mostrados), assim como observado em suspensões celulares de *S. viridis* (item 4.2.5, capítulo 2). Esses resultados reforçam a ideia que esta via de sinalização não seja totalmente conservada em gramíneas, podendo estar sobre a influência de outros fatores regulatórios. Alternativamente, as condições utilizadas ao longo do

experimento podem não ter sido ideais para direcionar de maneira efetiva a formação de elementos traqueais *in vitro*.

Figura 5. Bikinina é um composto que induz a formação de elementos traqueais em *Arabidopsis* pela inibição de GSK3s, quinases envolvidas na via de sinalização TDIF-TDR. A) Análise filogenética por *Maximum Likelihood* utilizando a sequência de nucleotídeos da família GSK3 em *Arabidopsis thaliana*, arroz, sorgo e cana-de-açúcar. Os valores nos ramos representam análise de suporte por Shimodaira-Hasegawa approximate likelihood-ratio test e ultrafast bootstrap, respectivamente. B) Via de sinalização TDIF-TDR que controla a formação de xilema em *Arabidopsis thaliana*. C) Cotilédones de *Arabidopsis thaliana* tratados por 4 dias com 10 μ M de bikinina na presença de luz. Os elementos traqueais formados a partir da transdiferenciação de células do mesofilo foram evidenciados pela coloração com floroglucinol.

A XY é um composto recentemente caracterizado como um indutor da diferenciação do xilema em *Arabidopsis thaliana* (Yoshimoto et al., 2016). Apresenta-se como um inibidor da síntese de termoespermina, que é uma poliamina capaz de inibir a formação de xilema por meio de um mecanismo semelhante ao da BK (Fig. 6B). A XY inibe a produção de um inibidor da diferenciação de elementos traqueais, disparando a formação deste tipo de célula. Além disso, os autores demonstraram que a combinação de XY com 2,4-D apresenta poder sinérgico na indução da diferenciação do xilema, pelo menos em espécies eudicotiledôneas (Yoshimoto et al., 2016). Dessa forma, realizamos uma análise filogenética no intuito de identificar genes ortólogos à *ACAULIS5* (*ACL5*) de *Arabidopsis thaliana* no SUCEST (<http://sucestfun.org>), visto que este gene codifica uma proteína responsável pela biossíntese de termoespermina e é alvo da ação da XY. Em cana-de-açúcar, um gene com alta similaridade à *ACL5* foi encontrado (Fig. 6A), suportando uma possível ação da XY em cana-de-açúcar. No entanto, assim como a BK, a XY não foi capaz de disparar o processo de transdiferenciação de elementos traqueais em cana-de-açúcar. Esses dados, juntamente com os dados reportados em *S. viridis*, sugerem que a via de atuação tanto da BK quanto da XY não são totalmente conservadas entre eudicotiledôneas e gramíneas, ou ainda que estas vias possam estar sobre a ação de outros mecanismos moleculares regulatórios.

Figura 6. Xilemina é um composto que induz a formação de elementos traqueais pela inibição da biossíntese de termoespermina, uma poliamina que inibe a formação de xilema. A) Análise filogenética por *Maximum Likelihood* utilizando a sequência de genes envolvidos na biossíntese de termoespermina em *Arabidopsis thaliana* e cana-de-açúcar. Genes *ACL5* caracterizados em outras espécies vegetais também foram incluídas. Os valores nos ramos representam análise de suporte por Shimodaira-Hasegawa approximate likelihood-ratio test e ultrafast bootstrap, respectivamente. B) Via de biossíntese de termoespermina e a ação da xilemina.

Conclusão: Como nas culturas de suspensão de *S. viridis*, não houve formação de elementos traqueais em suspensões celulares de cana-de-açúcar utilizando os compostos sintéticos que induzem a formação de xilema em *Arabidopsis*. Assim, é possível que os mecanismos regulatórios afetados pela BK e pela XY não sejam totalmente conservados entre eudicotiledôneas e gramíneas, ou ainda que as condições aqui testadas não foram capazes de estimular de maneira eficaz o processo de transdiferenciação de elementos traqueais *in vitro*.

5.2.5 Análise histoquímica *in vivo* dos elementos traqueais de cana-de-açúcar após dissociação dos tecidos

Visando avaliar se os padrões de espessamento de parede celular dos elementos traqueais formados pela transdiferenciação de células em suspensão seguem os mesmos padrões de deposição formados durante o desenvolvimento normal da planta (padrões *in vivo*), empregou-se um protocolo de dissociação de tecidos pelo tratamento de fragmentos do entrenó de cana-de-açúcar com uma solução contendo volumes iguais de peróxido de hidrogênio a 20% e ácido acético glacial (Franklin, 1945) a 60 °C. Neste experimento, utilizou-se a mesma variedade empregada na cultura de tecidos. Esta técnica permite a separação das células de um tecido através da dissolução da lamela média, permitindo assim a visualização dos elementos traqueais de forma isolada. Os elementos traqueais observados neste material *in vivo* apresentaram padrões de espessamento de parede celular do tipo anelar (Fig. 7A), espiralados ou helicoidais (Fig. 7B), reticulados (Fig. 7C) e pontoados (Fig. 7D).

Figura 7. Microscopia de luz das células de cana-de-açúcar, decorrentes do processo de dissociação celular (Franklin 1945) corado com Safrá-blau 0,05%. (A) Elementos traqueais com padrão de espessamento anelar; (B) elemento traqueal com padrão de espessamento espiralado ou helicoidal; (C) elemento traqueal com padrão de espessamento reticulado e (D) elemento traqueal de padrão pontado.

Figura 8. Microscopia de luz das células de suspensão cana-de-açúcar, decorrentes do experimento de indução de elementos traqueais (tratamento 2,4-D 10 µM + BL 10 µM) corado com Safrá-blau 0,05%. (A) Elemento traqueal induzido apresentando padrão de espessamento reticulado; (B) elementos traqueais induzidos formados no entorno das associações celulares.

As análises de microscopia de luz revelaram que o padrão de espessamento de parede celular encontrado nos elementos traqueais resultantes da indução das culturas em suspensão com 2,4-D 10 μ M + BL 10 μ M era similar ao espessamento reticulado (Fig. 8) e pontoado (Fig. 4C e D) encontrados nas análises *in vivo* (Fig. 7). Contudo, não foram encontrados os padrões anelar ou espiralado nas culturas, evidenciando a maior complexidade do sistema *in vivo*. Esta observação também sugere que os diferentes padrões de deposição de parede celular encontrados nos elementos traqueais após dissociação dos tecidos devem ser o produto de uma complexa via de sinalização, envolvendo diversos elementos que não foram completamente mimetizados nas combinações hormonais utilizadas nas culturas em suspensão. Tal observação também denota a complexidade e dificuldade em replicar eventos biológicos *in vitro*.

Conclusão: As análises de microscopia revelaram que os elementos traqueais provenientes dos experimentos de indução apresentaram padrão de espessamento semelhante aqueles encontrados *in vivo*. O padrão de espessamento reticulado e pontoado são caracterizados pelo depósito de parede celular a partir do metaxilema e caracteriza um dos estágios finais de deposição de parede celular secundária, exceto nas regiões de pontoações. Assim, é evidente que os elementos traqueais formados durante o processo de indução alcançaram as etapas finais de deposição de parede celular e lignina. No entanto, nem todos os padrões de deposição de parede que ocorrem naturalmente durante o desenvolvimento vascular em cana-de-açúcar foram encontrados nas culturas induzidas, o que reflete a complexidade deste processo.

5.2.6 Caracterização bioquímica e molecular da cultura xilogênica de cana-de-açúcar

Muitos estudos demonstraram que culturas xilogênicas apresentam expressão diferencial de determinados genes ao longo do processo de transdiferenciação dos elementos traqueais, que estão envolvidos nas diferentes fases do processo. Assim, as culturas xilogênicas são potenciais ferramentas para a identificação de genes envolvidos em diferentes processos que contribuem para a transdiferenciação de elementos traqueais, incluindo deposição de parede secundária e morte celular programada. Assim, a premissa do experimento de RT-qPCR era verificar se, ao longo

do processo de transdiferenciação nas culturas de cana-açúcar induzidas pelo tratamento com 2,4-D 10 μ M + BL 2,5 μ M, haveria a expressão diferencial de genes envolvidos no metabolismo de parede celular e lignina, que são o foco do nosso trabalho. As sequências dos primers para os genes selecionados foram obtidas na literatura para os genes de *C3H*, *4CL*, *CCoAOMT* e *CELLULOSE SINTASE* (*CesA9* e *CesA12*) (Casu et al., 2007), enquanto para os genes de *F5H* e *COMT*, os primers foram desenhados com base nas sequências obtidas do banco de dados SUCEST. Para as análises de expressão, as células induzidas foram mantidas sob agitação no escuro por uma semana, e os pontos de coleta foram: 0h, 24h, 48h, 72h e 7 dias (1W). A expressão foi analisada em um curto intervalo de tempo, e com curtos intervalos entre cada *time point* (Fig. 9), visto que a resposta em termos de variação de expressão gênica ocorre rapidamente, como observada em trabalhos anteriores com *Arabidopsis* e *Zinnia* (Demura et al., 2002; Kondo et al., 2015). As células coletadas foram utilizadas para a extração de RNA total, cuja integridade foi confirmada em gel de agarose 1% pela presença das bandas correspondentes as subunidades do RNA ribossomal (Fig. 9A). Os RNAs totais foram utilizados para a síntese de cDNA, cuja confirmação foi feita por RT-PCR convencional, utilizando primers para o gene constitutivo *GAPDH* (Iskandar et al., 2004). A eletroforese em gel de agarose 1% confirmou a amplificação dos fragmentos esperados, possibilitando assim sua utilização nas análises de RT-qPCR (Fig. 9B).

Figura 9. (A) Eletroforese em gel de agarose 1%, confirmando a integridade dos RNAs extraídos das células induzidas. (B) Eletroforese em gel de agarose 1%, confirmando a amplificação do gene a partir do template de cDNA, resultante da RT-PCR.

Figura 10. Análise de expressão gênica por RT-qPCR dos genes (A) C3H; (B) COMT; (C) 4CL; (D) F5H; (E) CCoAOMT; (F) Cesa9 e (G) Cesa12 ao longo do processo de transdiferenciação de elementos traqueais nas culturas de cana-de-açúcar induzidas com 2,4-D 10 μ M + BL 2,5 μ M. Letras diferentes representam médias diferentes por One-way ANOVA, seguido de teste Tukey. Barra de erro representa erro padrão, N=4, $p < 0,05$.

Os dados de expressão por RT-qPCR demonstraram que a expressão de determinados genes foi mais fortemente induzida ao longo da transdiferenciação,

enquanto para outros, este aumento na expressão relativa foi modesto, porém estatisticamente significativo (Fig. 10). Os genes do primeiro grupo foram *C3H*, *COMT* e *4CL* enquanto os genes do segundo grupo foram *F5H*, *CCoAOMT*, *CesA9* e *CesA12*. Os genes de *CELULOSE SINTASE* foram utilizados com base nos trabalhos de Casu e colaboradores (2007). Os autores evidenciaram que *CesA9* possui um gene homólogo em cevada (Burton et al., 2004) que estaria implicado na síntese de parede celular primária, enquanto o homólogo de *CesA12* estaria envolvido na síntese de parede celular secundária tanto em cevada (Burton et al., 2004) quanto em *A. thaliana* (Taylor et al., 2000; Taylor et al., 2003). Contudo, ambos os genes apresentaram expressão significativa no entrenó de cana-de-açúcar com ativa deposição de parede celular secundária, indicando que, nesta espécie, os dois genes poderiam participar dos mesmos processos (Casu et al., 2007). Em nossos resultados, houve um pequeno, mas significativo aumento da expressão relativa de *CesA9* e *CesA12* ao longo do processo de transdiferenciação, mostrando que o tratamento utilizado foi capaz de disparar a expressão de genes envolvidos no metabolismo de parede celular. Assim, o processo de indução de elementos traqueais foi acompanhado não apenas por alterações morfológicas dos elementos traqueais transdiferenciados, mas também por uma indução da expressão de genes envolvidos na deposição de parede celular secundária.

O processo de diferenciação dos elementos traqueais é caracterizado por distintas alterações citológicas (Devillard & Walter, 2014). Inicialmente, ocorre expansão celular, seguida pela deposição de parede celular secundária, e finalmente, morte celular programada (Fukuda, 1997; McCann, 1997; Fukuda, 2010). Assim, antecipamos que a indução da transdiferenciação de elementos traqueais nas culturas de cana-de-açúcar pelo tratamento com 10 μ M de 2,4-D e 2,5 μ M de BL resultaria em um aumento do conteúdo de lignina. Para testar esta hipótese, realizamos a quantificação de lignina através do método espectrofotométrico do brometo de acetila, capaz de detectar a quantidade de lignina dissolvida em solução ácida (Fahey & Jung, 1983). Como a deposição de parede celular e lignina é um processo cumulativo e terminal, a quantificação foi realizada em células induzidas nos seguintes pontos de coleta: 0h (não induzidas), após uma semana (1 W), após duas semanas (2 W), após três semanas (3 W) e após quatro semanas de tratamento (4 W). Esta análise revelou que ao longo das 4 semanas de tratamento houve um aumento significativo no

conteúdo de lignina em função da porcentagem de resíduo de parede celular (Fig. 11) (CWR).

Figura 11. Quantificação do conteúdo de lignina (% CWR) pelo método de brometo de acetila em suspensões celulares de cana-de-açúcar induzidas (tratamento 2,4-D 10 μ M + BL 10 μ M). Letras diferentes representam médias diferentes por One-way ANOVA, seguido de teste Tukey. Barra de erro representa erro padrão, N=4, $p < 0,05$.

A utilização do método fez-se necessária para confirmar que o processo de diferenciação de elementos traqueais estabelecido resultou não apenas em alterações morfológicas da célula, como estimulou o metabolismo de lignina. É interessante observar que mesmo no ponto zero, em que as células não foram induzidas e, portanto, não apresentam deposição de parede secundária, aparentemente uma quantidade expressiva de lignina foi detectada. Este resultado pode ser explicado pela presença de significativa quantidade de hidroxicinamatos na parede celular primária das gramíneas (Vogel, 2008; Fukushima et al., 2015), que vão contribuir para valores mais elevados de absorbância durante a quantificação de lignina pelo método de brometo de acetila. Assim, concentrações relativas de hidroxicinamatos ligados à lignina de gramíneas podem explicar absorbâncias elevadas resultantes desse método (Morrison & Stewart, 1995). Contudo, este aumento no conteúdo de lignina durante o tratamento é corroborado tanto pela identificação dos elementos traqueais através de análises microscópicas quanto pela indução da expressão de genes envolvidos no metabolismo de lignina.

Conclusão: Os resultados demonstraram que o processo de indução de transdiferenciação de elementos traqueais *in vitro*, utilizando 2,4-D 10 μ M + BL 2,5 μ M, foi capaz de promover significativa indução na expressão de diversos genes relacionados ao processo de deposição de parede secundária. Ademais, o tratamento foi capaz de induzir um aumento no conteúdo de lignina ao longo de quatro semanas. Assim como em outras culturas xilogênicas, este sistema torna-se uma potencial ferramenta no estudo dos processos que permeiam o desenvolvimento vascular e a deposição de parede celular secundária em cana-de-açúcar, uma importante gramínea de aplicação bioenergética

5.2.7 Estabelecimento de culturas de protoplastos

Protoplastos, células vegetais desprovidas de parede celular, são importantes ferramentas no campo de engenharia genética. Os primeiros protoplastos foram isolados a partir de isolamento mecânico (Klercker, 1982). A ausência de parede celular torna o protoplasto um sistema útil para numerosos estudos, como extração de organelas celulares, transferência gênica por transformação genética e produção de novos genótipos por hibridização somática (Castro, 2009). As culturas de protoplastos podem ser obtidas tanto de tecidos intactos como raiz e mesófilo foliar, quanto de calos e suspensões celulares, através de isolamentos mecânicos ou químicos. Dessa forma, o estabelecimento do sistema de protoplastos, juntamente com a cultura xilogênica, constituem ferramentas importantes para estudos moleculares sobre deposição de parede celular secundária em gramíneas C4. Assim, a cultura de células em suspensão de cana-de-açúcar foi utilizada no estabelecimento de cultura de protoplastos. As suspensões celulares com 10 dias de crescimento foram utilizadas no estabelecimento dos protoplastos, as quais tiveram suas paredes digeridas pelo uso do tampão de digestão contendo celulase 4,6% e macerozyme 2% (Morohashi et al., 2012). Os protoplastos estabelecidos, foram transfectados com PEG 40%, utilizando 10 μ g de DNA plasmidial contendo um vetor de expressão do gene GFP sob controle do promotor 35S (Fig 12). Este plasmídeo foi escolhido pois permite uma rápida observação e eficiente quantificação dos protoplastos transfectados. Foram testados diferentes meios de incubação, no intuito de analisar a viabilidade dos protoplastos e a eficiência da transfecção. Além de testar os meios de incubação utilizados com base nas publicações de milho (Morohashi et al., 2012) e células BY-2 de tabaco (Vanden Bossche et al., 2013), estes também serviram como base para

uma ligeira modificação pela adição de 50 μM de CaCl_2 , pois estudos anteriores demonstraram que protoplastos de cana-de-açúcar apresentavam maior viabilidade com o aumento da concentração de CaCl_2 de 10 μM para 50 μM (Chen et al., 1988). A taxa de transfecção dos protoplastos foi similar entre os quatro tratamentos utilizados (tabela 3).

Tabela 3. Taxa de protoplastos transfectados utilizando diferentes meios de incubação após o processo de transfecção química com PEG.

Tratamento	Protoplastos totais	Protoplastos transformados	Taxa de protoplastos transformados (%)
Meio de incubação (Morohashi et al., 2012)	191	34	16,25 $\pm$ 3,59
Meio de incubação (Morohashi et al., 2012) + 50 μM de CaCl_2	298	44	15,0 1 $\pm$ 3,50
Meio MS sem hormônio (Vanden Bossche et al., 2013)	195	27	9,12 $\pm$ 0,83
Meio MS sem hormônio (Vanden Bossche et al., 2013) + 50 μM de CaCl_2	263	38	13,07 $\pm$ 1,87

Embora suspensões celulares possibilitem uma maior superfície contato entre as células e os compostos-alvo, elicitores e/ ou enzimas, quando comparados à tecidos intactos, as análises de microscopia de luz revelaram a presença de células cujas paredes celulares não foram digeridas. A fim de isolar os protoplastos obtidos,

o conteúdo resultante do processo de digestão enzimática foi filtrado em meshes sobrepostas de 60 (0,191 mm de diâmetro da malha), 100 (0,114 mm de diâmetro da malha) e 150 (mm de diâmetro da malha). Contudo, ainda foi possível visualizar células que não apresentaram digestão de suas paredes celulares, o que pode ter afetado a taxa de transfecção, visto que o DNA plasmidial pode se aderir a superfície de células intactas ao invés dos protoplastos. As análises de microscopia revelaram a presença de protoplastos transformados através da expressão da proteína GFP (Fig. 12), que apresentam fluorescência verde quando excitadas pelo laser. Dessa forma, a observação de uma quantidade significativa de protoplastos que expressam GFP demonstra o sucesso do estabelecimento de um protocolo de preparo e transfecção de protoplastos para cana-de-açúcar.

Figura 12. Protoplastos transfetados através de transfecção química utilizando PEG (Vanden Bossche et al., 2013). Protoplastos em solução de incubação de acordo com o protocolo para milho (Morohashi et al., 2012), em microscopia de campo claro (A) e em microscopia de fluorescência (B).

Conclusão: Os protoplastos foram eficientemente obtidos a partir da digestão de suspensões celulares de cana-de-açúcar com uma combinação de celulase e macerozyme. Embora existam relatos na literatura sobre a influência de CaCl_2 sobre a viabilidade dos protoplastos de cana-de-açúcar, nossos resultados revelaram taxas similares no processo de transfecção entre os quatro tratamentos analisados. A transformação dos protoplastos foi evidenciada pela observação de fluorescência pela expressão da proteína GFP por meio de microscopia.

5.3 CONCLUSÃO GERAL

O processo de diferenciação de elementos traqueais ocorre através de uma sequência de eventos bem coordenados de diferenciação celular e morte celular programada (Iakimova & Woltering, 2017). Durante muitos anos, um sistema clássico para estudos de xilogênese foram as culturas estabelecidas a partir de células do mesofilo de *Z. elegans* (Fukuda & Komamine, 1980). Este sistema celular permitiu investigar componentes regulatórios e mecanismos que permeiam o processo de xilogênese (Iakimova & Woltering, 2017). O conhecimento adquirido a partir desse sistema possibilitou também a realização de estudos em outras culturas xilogênicas, que denotaram a expressão diferencial de genes para cada fase do processo. Kondo e colaboradores (2014) demonstraram a partir de culturas xilogênicas de *A. thaliana* que as proteínas GSK3 atuam como reguladores centrais no processo de diferenciação de células do procâmbio para células do xilema. Em suas análises, o mutante sêxtuplo para GSK3 ocasionalmente exibiu um aumento na diferenciação de células do procâmbio em hipocótilo (Kondo et al., 2014). Contudo, tal fenótipo pode ser mimetizado utilizando um composto denominado BK que atua como um inibidor químico de quinases GSK3 (Kondo et al., 2014). Mais tarde, tal sistema possibilitou a investigação de clusters gênicos expressos diferencialmente durante as etapas do processo de transdiferenciação de elementos traqueais em discos foliares de *Arabidopsis*, através do uso da BK. Nas primeiras 12 horas de tratamento com BK, foi observado a diminuição da expressão de genes do mesofilo ou de células epidérmicas, sugerindo que a identidade de tais células foram perdidas (Kondo et al., 2015). Em contraste, os níveis de expressão de genes como *MP*, *TDR*, *AtHB8* e *TMO6*, que são conhecidos marcadores de procâmbio apresentaram aumento entre 12 e 24 horas (Kondo et al., 2015). Após 36 horas, genes característicos do xilema como *VND6*, *XCP1* e *LBD15* apresentaram aumento significativo nos níveis de expressão (Kondo et al., 2015). Tais dados forneceram suporte para a hipótese de que as células do mesofilo primeiramente se transdiferenciam em células procambiais, que por sua vez se diferenciam em células do xilema. Estes estudos demonstram que culturas xilogênicas são importantes ferramentas na identificação e caracterização de genes e/ou processos que permeiam a formação de elementos traqueais, deposição de parede celular secundária e morte celular programada. Assim, o estabelecimento

de culturas xilogênicas em gramíneas se mostra interessante para a elucidação de processos específicos sobre deposição de parede celular secundária neste grupo.

É evidente que os hormônios vegetais são importantes durante o desenvolvimento vascular tanto *in vivo* quanto *in vitro*, de forma que diferentes hormônios podem apresentar distintos papéis em diferentes culturas. Ogita e colaboradores (2012) evidenciaram que culturas celulares de bambu se transdiferenciavam em elementos traqueais na presença da citocinina BA. Contudo, as suspensões celulares de cana-de-açúcar se diferenciaram em elementos traqueais na presença de TDZ, uma outra citocinina. Sabe-se que citocininas atuam sobre o desenvolvimento vascular pela promoção da proliferação de células do câmbio e do procâmbio (Fukuda & Komamine, 1980; Aloni, 1993; Fukuda, 1997; Milhinhos & Miguel, 2013; Pesquet et al., 2013). Assim, embora ainda não esteja claro os mecanismos exatos pelos quais a citocinina atua sobre o processo de transdiferenciação de elementos traqueais em suspensões celulares, é evidente que tanto em culturas de bambu quanto em cana-de-açúcar, este hormônio vegetal foi capaz de disparar o processo. Diferente dos dados reportados por Kondo e colaboradores (2015), onde a presença de luz foi evidenciada como um importante fator na indução da formação de elementos traqueais em discos foliares de *Arabidopsis*, nossos resultados revelaram que, sob as condições testadas, a luz não se apresentou como um fator limitante na formação dos elementos traqueais, visto que estes se formaram tanto na presença, quanto na ausência de luz.

Nossas análises sugerem que ao menos duas combinações hormonais são requeridas no processo de transdiferenciação de elementos traqueais em culturas de cana-de-açúcar, sendo elas: (i) 2,4-D e BL; (ii) 2,4-D e TDZ; e (iii) TDZ e BL. Embora os tratamentos contendo TDZ resultaram na formação de elementos traqueais, após duas semanas, apresentaram intensa oxidação das células, dificultando a visualização. Assim, dentre os tratamentos realizados, identificamos que o tratamento contendo 2,4-D e BL foi o que apresentou melhor resposta no processo de indução de elementos traqueais, pois resultou na formação efetiva de elementos traqueais e manteve a viabilidade da cultura. Condizente com os resultados obtidos, outros trabalhos evidenciam o papel de BL no processo de formação de elementos traqueais. Em culturas de *Z. elegans*, durante o estágio II do processo de transdiferenciação, fatores de transcrição envolvidos na síntese de brassinosteróides se acumulam em células procambiais, as quais se diferenciam em células precursoras do xilema

(Yamamoto et al., 1997). Iwasaki & Shibaoka (1991) demonstraram que a aplicação exógena de uniconazole ((E)-(RS)-1-(4-Chlorophenyl)-4,4-dimethyl-2-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)pent-1-en-3-ol), que é um inibidor da síntese de brassinosteróides e giberelina (Turner et al., 2007), em células isoladas do mesofilo de *Zinnia* impedia a diferenciação das células em elementos traqueais sem inibir a divisão celular, e que a aplicação de BL era capaz de restaurar o efeito inibidor. Estes resultados sugerem que BL está intimamente relacionado ao processo de diferenciação de elementos traqueais.

Outros compostos sintéticos previamente descritos na literatura como indutores da diferenciação do xilema na planta-modelo *A. thaliana*, como BK (Kondo et al., 2015; Kondo & Fukuda, 2015) e XY (Yoshimoto et al., 2016), foram utilizados nos testes de indução de elementos traqueais em culturas de cana-de-açúcar. Contudo, tais compostos não apresentaram atividade quanto a diferenciação de elementos traqueais tanto em *Setaria viridis* quanto em cana-de-açúcar, para a qual obtivemos resultados positivos na utilização de fitormônios. Assim, é possível que os processos moleculares que coordenam a transdiferenciação de elementos traqueais em espécies eudicotiledôneas possam não ser totalmente conservados em gramíneas, possivelmente decorrente de eventos evolutivos ao longo das duas linhagens (Li and Brutnell, 2011b). Estes resultados denotam a complexidade de se extrapolar o conhecimento produzido em espécies eudicotiledôneas para gramíneas.

Os elementos traqueais formados durante o processo de transdiferenciação nas culturas de cana-de-açúcar encontravam-se predominantemente nas regiões de borda dos pequenos calos ou associações celulares. Outros trabalhos também reportam tal fato (Fukuda, 1992; Oda et al., 2005). Motose e colaboradores (2004) revelaram que a comunicação intracelular participa do processo de diferenciação de elementos traqueais através de uma proteína denominada *xylogen*, a qual é emitida pelas células em diferenciação. Análises de células de *Zinnia* imobilizadas em agarose demonstraram que os elementos traqueais se formam tipicamente em *clusters* celulares, sugerindo mais uma vez que o processo de diferenciação tende a promover a diferenciação de células vizinhas (Motose et al., 2001). Assim é possível que a comunicação célula-célula favoreça a transdiferenciação dos elementos traqueais em *clusters* celulares, como nos dados obtidos em suspensões celulares de cana-de-açúcar.

As análises de microscopia confocal revelaram que os elementos formados pela indução do processo de transdiferenciação apresentaram padrões reticulado e pontado de deposição de parede celular. Tais padrões também foram encontrados quando tecidos do colmo de cana-de-açúcar foram dissociados utilizando ácido acético e peróxido de hidrogênio (Franklin, 1945) e analisados por microscopia. Outros autores também denotaram distintos padrões de deposição de parede celular secundária em elementos traqueais induzidos, os quais condizem com os padrões encontrados *in vivo* (Fukuda & Komamine, 1980b; Oda et al., 2005; Negi et al., 2015). Tais evidências suportam que, ao menos em parte, os mecanismos moleculares que controlam a diferenciação de elementos traqueais durante o desenvolvimento normal da planta foram mimetizados pelo tratamento aplicado às células em suspensão, visto que os padrões de deposição de parede celular encontrados são comuns em ambos os processos. Além de alterações morfológicas relacionadas a deposição de parede celular secundária, o tratamento também induziu a expressão de genes envolvidos neste processo. Os genes *C3H*, *COMT* e *4CL*, que codificam importantes enzimas na via de biossíntese de lignina, apresentaram aumento significativo na expressão entre 24 e 48 horas de tratamento, enquanto a expressão dos genes *F5H*, *CCoAOMT*, *CesA9*, *CesA12* apresentou um aumento modesto entre 48 e 1 semana. Tais resultados podem ser suportados ainda pelo aumento significativo no conteúdo de lignina das células induzidas ao longo de quatro semanas de tratamento. Assim, os dados morfológicos, os quais revelaram os padrões de deposição de parede celular, as análises de expressão de genes envolvidos no metabolismo de parede celular e lignina e o aumento no conteúdo de lignina corroboram a eficiência do protocolo de estabelecimento da cultura xilogênicas em cana-de-açúcar. Complementando o estabelecimento desta ferramenta, as suspensões celulares de cana-de-açúcar foram utilizadas no estabelecimento de um sistema de protoplastos. Os protoplastos foram submetidos a diferentes soluções de incubação, na presença e ausência de CaCl_2 , visto que sua utilização aumenta a viabilidade e previne a lise dos protoplastos (Chen et al., 1988). Contudo, não houve diferença entre os tratamentos testados, os quais apresentaram até 16,25 % de protoplastos transfectados. Assim, o estabelecimento tanto da cultura xilogênica, quanto de protoplastos em cana-de-açúcar, possibilitam a realização de futuros estudos sobre a transdução de sinais, redes transcricionais regulatórias, avaliação da expressão de genes e elucidação de processos e/ou

mecanismos envolvidos na deposição de parede celular e metabolismo de lignina em monocotiledôneas.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

5.4.1 *Indução de calos de cana-de-açúcar a partir de palmito*

Plantas de cana-de-açúcar variedade SP-803280 foram cultivadas em casa de vegetação sob regime de dias longos (ciclos de 16h:8h luz:escuro) e temperaturas entre 17 e 27°C. O estabelecimento dos calos foi feito a partir do palmito de plantas com aproximadamente 30 cm de altura. Os mesmos foram submetidos à assepsia em câmara de fluxo laminar utilizando etanol 70% por um minuto, e hipoclorito de sódio 50% por 15 minuto seguido de lavagens sequenciais com água destilada estéril. Os palmitos foram cortados em secções transversais de aproximadamente 3 mm, que foram utilizados como explante e inoculados individualmente em tubo de ensaio contendo 20 mL do meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 20 g/L de sacarose, 1 mg/L de 2,4-D e 7 g/l de ágar (Macedo & Silveira, 2010). As culturas foram mantidas no escuro a 25°C e subcultivadas após 4 semanas.

5.4.2 *Curva de crescimento celular de cana-de-açúcar*

Esta análise foi realizada utilizando um sistema no qual um *erlenmeyer* de 50 mL foi acoplado a um tubo falcon de 15 mL. Nesse sistema, as células em suspensão de cana-de-açúcar foram filtradas em mesh 60 (0,191 mm de diâmetro da malha) e então 20 mg de células foram gentilmente transferidas para 20 mL meio de cultura específico para as distintas culturas como descrito nos itens 2.2 acima, que permaneceram sob agitação 120 rpm, 25°C no escuro. A cada dois dias até o fim de 21, as culturas foram analisadas e seus valores referentes ao volume de célula sedimentada foram anotados, possibilitando a utilização dos dados na construção das curvas de crescimento. A curva de crescimento celular foi construída utilizando-se o volume de célula sedimentada presente após a inversão do sistema *erlenmeyer* - falcon.

5.4.3 *Células em suspensão de cana-de-açúcar*

Calos friáveis foram utilizados no estabelecimento das células de suspensão de cana-de-açúcar. Cerca de 300 mg de calos friáveis foram gentilmente fragmentados e posteriormente inoculados em 30 mL de meio líquido contendo os

sais e vitaminas do meio MS suplementado com 20 g/L de sacarose, 1 mg/L de 2,4-D. As culturas foram incubadas em agitadores a 120 rpm, 25 °C no escuro e subcultivadas a cada 21 dias.

5.4.4 Testes de indução de elementos traqueais em culturas de suspensão de cana-de-açúcar

Primeiramente, os testes de indução de transdiferenciação de elementos traqueais nas culturas de cana-de-açúcar foram realizados seguindo o protocolo estabelecido para bambu (Ogita et al., 2012), utilizando as culturas com 10 dias de crescimento. As culturas foram filtradas em mesh de 60 (0,191 mm de diâmetro da malha) e posteriormente 300 mg de células foram inoculadas em meio de indução contendo as seguintes concentrações hormonais:

- A. Meio MS controle;
- B. Meio MS +2,4-D 10 µM;
- C. Meio MS +2,4-D 30 µM;
- D. Meio MS + BA 10 µM;
- E. Meio MS + BA 30 µM;
- F. Meio MS + ANA 10µM;
- G. Meio MS + ANA 30 µM;
- H. Meio MS + GA₃ 10 µM;
- I. Meio MS + (GA₃) 30 µM;
- J. Meio MS + TDZ 10 µM;
- K. Meio MS + TDZ 30 µM.

As culturas então permaneceram sob agitação 120 rpm, 25°C sob tratamentos de luz e escuro, tendo uma alíquota retirada para as análises de microscopia de luz a cada 7 dias, até o final de 28 dias após o início da indução das células.

Posteriormente, diferentes concentrações e combinações hormonais foram testadas com base nos protocolos estabelecidos para *switchgrass* contendo BL (Shen et al., 2013) e TDZ, além de macro e micro nutrientes do meio MS (4.3 g/L) e 30 g/L de sacarose. Desse modo diferentes tratamentos foram utilizados:

- A. 2,4-D 10 µM + 0 µM BL;
- B. 2,4-D 10 µM + 0,2 µM BL;
- C. 2,4-D 10 µM + 1 µM BL;
- D. 2,4-D 10 µM + 2,5 µM BL;

- E. 2,4-D 10 μ M + 10 μ M BL;
- F. 2,4-D 0 μ M + 0,2 μ M BL;
- G. 2,4-D 0 μ M + 1 μ M BL;
- H. 2,4-D 0 μ M + 2,5 μ M BL;
- I. 2,4-D 0 μ M + 10 μ M BL;
- J. 2,4-D 10 μ M + TDZ 10 μ M + 0 μ M BL;
- K. 2,4-D 10 μ M + TDZ 10 μ M + 0,2 μ M BL;
- L. 2,4-D 10 μ M + TDZ 10 μ M + 1 μ M BL;
- M. 2,4-D 10 μ M + TDZ 10 μ M + 2,5 μ M BL;
- N. 2,4-D 10 μ M + TDZ 10 μ M + 10 μ M BL;
- O. 2,4-D 0 μ M + TDZ 10 μ M + 0 μ M BL;
- P. 2,4-D 0 μ M + TDZ 10 μ M + 0,2 μ M BL;
- Q. 2,4-D 0 μ M + TDZ 10 μ M + 1 μ M BL;
- R. 2,4-D 0 μ M + TDZ 10 μ M + 2,5 μ M BL;
- S. 2,4-D 10 μ M + TDZ 10 μ M + 10 μ M BL.

As culturas de células em suspensão de cana-de-açúcar foram ainda submetidas a tratamento contendo BK com algumas modificações do protocolo de indução ectópica estabelecido para *Arabidopsis thaliana* (Kondo et al., 2015). Assim, 300 mg de células filtradas em mesh 60 (0,191 mm de diâmetro da malha) foram transferidas para os meios de indução contendo macro e micro nutrientes do meio MS (4.3 g/L), 30 g/L de sacarose e 2 mg/L de 2,4-D. Os tratamentos contendo BK consistiu das seguintes combinações:

- D. Meio MS contendo 100 μ L de DMSO;
- E. Meio padrão + 10 μ M de BK (dissolvida em DMSO);
- F. Meio padrão + 20 μ M de BK (dissolvida em DMSO).

As culturas permaneceram sob agitação 120 rpm, 25°C na luz e no escuro, tendo uma alíquota analisada a cada 7 dias através de microscopia de luz. Adicionalmente, a XY, um inibidor da biossíntese de termoespermina, foi utilizada em testes de indução. Os dados reportados por Yoshimoto e seus colaboradores (2016) indicam que o uso combinado de XY e auxina sintética apresentam efeito sinérgico sobre a diferenciação do xilema. Assim, diferentes combinações foram utilizadas a fim de testar a indução da transdiferenciação das suspensões celulares em elementos traqueais: i) 2,4-D 10 μ M + ausência de XY; ii) 2,4-D 10 μ M + XY 10 μ M.

As culturas permaneceram sob agitação 120 rpm, 25°C no escuro, tendo uma

alíquota analisada a cada 7 dias através de microscopia de luz.

5.4.5 *Análise de microscopia dos elementos traqueais induzidos*

Para identificar os elementos traqueais após o tratamento de indução foram utilizados três diferentes técnicas em microscopia. Inicialmente o tratamento com floroglucinol 1% (Johansen, 1940) foi utilizado e analisado em microscopia de luz utilizando microscópio Zeiss Axio Imager M2 acoplado a câmera Zeiss AxioCam HRc. Para as análises de floroglucinol, duas soluções foram preparadas: i) Solução A, contendo 1g de floroglucinol diluído em 100 mL de etanol 95%; ii) Solução B, contendo 68 mL ácido clorídrico 37% e 32 mL de água destilada. As lâminas foram montadas utilizando 200 µL de cada tratamento analisado, utilizando 30 µL das soluções A e B. Para a identificação dos elementos traqueais através de microscopia de fluorescência, as lâminas foram montadas utilizando 200 µL de cada tratamento e analisadas em microscópio Zeiss Axio Imager M2 acoplado a câmera Zeiss AxioCam HRc, utilizando o espectro de luz verde (390-480 nm). Por fim, as lâminas contendo os elementos traqueais induzidos foram analisadas em microscopia a laser confocal, utilizando microscópio Zeiss LSM 880 Axio Observer e o método de contraste por fluorescência com excitação do laser em 488 nm.

5.4.6 *Análise histoquímica in vivo dos elementos traqueais de cana-de-açúcar após dissociação dos tecidos*

Para identificar morfologicamente o padrão de espessamento dos elementos traqueais *in vivo*, utilizou-se um protocolo de dissociação de elementos celulares (Franklin, 1945). O colmo de cana foi seccionado em pequenos cubos de aproximadamente 1 cm. O material foi então colocado em solução de peróxido de hidrogênio e ácido acético 1:1 (v/v), permanecendo 48 horas em estufa a 60° C. Após esse período o material foi lavado em etanol 50% e então corado com Safranin O 0,055% (Luque et al., 1996) e montados em lâmina com glicerina para análises de microscopia ótica.

5.4.7 *Quantificação bioquímica da lignina deposita durante o processo de indução de elementos traqueais pelo método de brometo de acetila*

As culturas de suspensão de cana-de-açúcar foram induzidas durante a fase exponencial de crescimento (10 dias) e submetidas ao tratamento de 10 µM de 2,4-D

e 2,5 μ M de brassinolide, conforme descrito no item 5.4.4. Para as análises foram inoculados 500 mg de células em 30 mL de meio de indução. As culturas permaneceram sob agitação 120 rpm, 25°C no escuro. Foram realizadas quatro replicatas para os seguintes pontos de coleta: 0 h (sem indução), uma semana, duas semanas, três semanas e quatro semanas de tratamento. A coleta das células foi realizada através de filtração a vácuo e armazenadas em freezer -80°C.

As células congeladas foram secas em liofilizador e posteriormente maceradas. Cerca de 20 mg do material foram utilizados no preparo do resíduo de parede celular (CWR). O preparo foi realizado a partir de extrações sequenciais de 15 minutos utilizando temperaturas próximas de ebulição para água (98°C), etanol (76°C), etanol + clorofórmio (1:1) (59°C) e acetona (54°C), seguido de secagem a vácuo (Van Acker et al., 2013).

Para a quantificação de lignina, utilizou-se o método espectrofotométrico de brometo de acetila. Assim, cerca de 10 mg de CWR foi incubada em 250 μ L de solução de 25% de brometo de acetila em ácido acético glacial, por duas horas à 50°C. Após duas horas de incubação, as amostras foram colocadas em agitação de 1500 rpm por uma hora à 50°C. Em seguida as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 10.000 rpm. Em *ependorfs* vazios foram adicionados 400 μ L de NaOH 2M, 75 μ L *hydroxylamine hydrochloride* 0,5M, 100 μ L do sobrenadante resultante da extração com brometo de acetila e 1,425 mL de ácido acético glacial (Van Acker et al., 2013). A quantidade de lignina foi calculada segundo a lei de Lambert-Beer: $A/(\epsilon \cdot l) \cdot 5$, em que A é a média das três leituras de absorbância, ϵ é o coeficiente de extinção (coeficiente universal $\epsilon=23,0772$; Fukushima & Kerley, 2011) e a multiplicação pelo número 5 corresponde ao fator de diluição. Por fim, a quantidade de lignina foi multiplicada por 100 a fim de expressar a lignina como porcentagem de CWR.

5.4.8 Extração de RNA, síntese de cDNA e análise de expressão gênica

As suspensões celulares induzidas durante a fase exponencial de crescimento (10 dias) utilizando o tratamento de 10 μ M de 2,4-D e 2,5 μ M de brassinolide foram coletadas através de filtração a vácuo nos seguintes tempos: 0 h (não induzidas), 24 h, 48 h, 72 h e uma semana e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Subsequentemente, as células foram maceradas até a obtenção de um pó fino. A extração de RNA utilizou 100 mg de células maceradas, utilizando o kit ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System (Promega) de acordo com as instruções do fabricante.

Para a síntese de cDNA, 1 µg de RNA de cada amostra foi utilizada com o kit GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega), de acordo com as especificações do fabricante. A amplificação dos fragmentos de cDNA foi confirmada através de eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. As análises de expressão dos genes envolvidos no metabolismo de parede celular e lignina via RT-qPCR foram realizadas no equipamento QuantStudio 6 Flex (Applied Biosystems by Life Technologies). As reações foram realizadas utilizando o kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) de acordo com as especificações do fabricante. As reações foram executadas em triplicata para cada uma das quatro réplicas biológicas.

5.4.9 Primers

Os primers utilizados nas análises de expressão gênica foram utilizados com base em publicações prévias ou desenhados a partir de sequências obtidas no SUCEST com o auxílio da ferramenta Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Os parâmetros utilizados foram: amplicon de 70 – 200 pb, primers entre 18-27 pb, temperatura de melting de 57-63 °C e conteúdo de CG de no máximo 80%. As sequências de todos os primers utilizados estão na tabela 17.

Tabela 17. Sequência dos primers utilizados nas análises de qRT-PCR.

Identificação	Nº de acesso	Sequência (5'- 3'/ FW- RV)	Referência
<i>ShPUB</i>	SCRUFL4024C06.b	CCGGTCCTTTAAACCAACTCAGT	Ferreira, 2013
		CCCCTGGTGTACCTCCATTTG	
<i>ShUBE2</i>	SCRUFL4024C06.b	CAGGTCCTGCTGGTGAGGAT	Ferreira, 2013
		CACCTCCAGCATATGGACTATCAG	
<i>GAPDH</i>	SCQGAM2027G09.g	TTTGAATGGCAAGCTCACTG	Iskandar et al., 2004
		GGTGGAAAACCAAATCCTCCT	
<i>Sh4CL</i>	SCCCCL3002A03.g	AGCCGTTCCAGGTCAAGTC	Bottcher et al., 2013
		CTCGGGGTCGTTCAGGTAA	

<i>ShC3H</i>	SCVPCL6041E07.g	CCGGTCTCGTCACCTTCA	Bottcher et al., 2013
		CAACAGCATCAGCTTCCAAA	
<i>ShCCoAOMT</i>	SCAGCL6012G12.g SCCCLR1069B09.g SCCCLR1079A02.g SCRUFL4024C06.b	GACGCCGACAAGGACAAC	Bottcher et al., 2013
		CACGAAGTCGCGGTAGAAG	
<i>ShCOMT</i>	SCRFLR1012F12.g	TAAATACGCACACCTGCTCT	Desenhado
		ATTCGACAATTTAGAATCCAGAACAT	
<i>ShF5H</i>	SCEZHR1087F06.g	TGCACAAC TAGCCATGAGAATACC	Desenhado
		CCTTCATTA AAAACCATGCCTGATC	
<i>ShCesA9</i>	Sof.4824.2.S1_a_at	CGCTGGATTTGATGATGAGA	Casu et al., 2007
		CATCAGAGTGGAGGCAACAA	
<i>ShCesA12</i>	Sof.2699.1.S1_a_at	CACCTCTACCCGTTCTCTCAA	Casu et al., 2007
		ACCCAGAGCAGGGAGAAGAT	

5.4.10 Estabelecimento de um sistema de protoplastos a partir de células de suspensão

As culturas de células em suspensão foram utilizadas na fase exponencial da curva de crescimento (10 dias), sendo filtradas em mesh 60 (0,191 mm de diâmetro da malha). As células que passaram pela malha da mesh foram coletadas em tubos falcons de 50 mL e então centrifugadas por 5 minutos a 250xg, removendo o sobrenadante. Após a remoção do sobrenadante, foram adicionados 10 ml de tampão de digestão (Manitol 0.6M, MES 10mM pH 5.7, BSA 1%, CaCl₂ 1mM, Cellulase Onozuka RS 4.6%, macerozyme 2%, ambas da marca Ducheфа Biochemistries) e as culturas foram incubadas sob agitação 100 rpm a 25 °C por 15 horas (adaptado de Morohashi et al., 2012). Após o período de digestão enzimática, as células foram filtradas em meshes sobrepostas de 150 (0,066 mm de diâmetro da malha), 100 (0,114 mm de diâmetro da malha) e 60 (0,191 mm de diâmetro da malha) e lavadas em tampão de lavagem (Manitol 0.6M, MES 4mM pH 5.7, KCl 20mM) (Morohashi et al., 2012), seguido de centrifugação por 5 minutos a 200xg. Após a centrifugação, os protoplastos foram contados em câmara de *neubauer*, e diluídos quando necessário

para uma concentração de 1×10^6 protoplastos/mL, utilizando o tampão de lavagem. Para a transfecção, bactérias transformadas, expressando um vetor contendo o gene GFP sob controle do promotor 35S foram cedidas pelo pós-doutorando Sávio Siqueira Ferreira e crescidas em meio LB líquido (Sambrook et al., 1989), na presença do antibiótico carbenicilina. O DNA plasmidial foi extraído utilizando o kit Plasmid Maxi Kit QUIAGEN®, de acordo com as especificações do fabricante. Após a extração, 10 µg do DNA plasmidial foram adicionados em 100 µL de protoplastos em uma placa de 24 poços e submetidos a transfecção química utilizando 120 µL da solução de polietilenoglicol (PEG 3350) 40% (0,4 M manitol; 0,1 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) durante 10 minutos, seguindo pela adição de 600 µL de meio W5 (0,4 M manitol; 154 mM NaCl, 125 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 5 mM KCl; 5 mM glicose; 1,5 mM MES; pH 5.8) (Vanden Bossche et al., 2013) por mais 10 minutos. Após 10 minutos os protoplastos decantaram e o sobrenadante foi revido. Para a solução de incubação (800 µL), foram utilizadas 4 diferentes formulações:

- A. Solução de incubação (Manitol 0.6M, MES 4mM pH 5.7, KCl 4mM) (Morohashi et al., 2012);
- B. Solução de incubação (Morohashi et al., 2012) + 50 µM de CaCl_2 ;
- C. Meio MS sem hormônio (Vanden Bossche et al., 2013);
- D. Meio MS sem hormônio (Vanden Bossche et al., 2013) + 50 µM de CaCl_2 .

Os protoplastos então permaneceram incubados de 16-24 horas no escuro. A análise dos protoplastos transformados foi realizada utilizando a câmara de *Neubauer* e microscópio Zeiss Axio Imager M2 acoplado a câmera Zeiss AxioCam HRc, utilizando o espectro de luz verde (390-480 nm). A contagem dos protoplastos na câmara de *Neubauer* foi referente a área de 16 quadrados de $0,0625 \text{ mm}^2$ (total de 1 mm^2). A taxa de protoplastos transformados foi medida pela quantidade de protoplastos transformados multiplicado por 100 e dividido pela quantidade de protoplastos não transformados.

6 CONCLUSÃO FINAL

Neste trabalho, utilizamos três espécies: i) *Sorghum bicolor*; ii) *Setaria viridis* e iii) cana-de-açúcar, no intuito de estabelecer um sistema de células em suspensão para estudos de parede celular secundária em gramíneas C4. O objetivo era utilizar

as culturas de células em suspensão no estabelecimento de duas ferramentas: culturas xilogênicas e um sistema de protoplastos. Inicialmente, a espécie-alvo era o sorgo, visto que tal gramínea é foco de outros projetos do nosso grupo de pesquisa, incluindo um Projeto JP BIOEN Fapesp (Processo Fapesp nº 2015/02527-1). No entanto, o sorgo se mostrou uma espécie de caráter extremamente recalcitrante na cultura de tecidos. Na tentativa de se obter calos friáveis que pudessem ser utilizados no estabelecimento de células em suspensão, foram utilizados quatro genótipos cinco fontes de explantes, com diferentes combinações hormonais e meios de indução. Apenas quando embriões imaturos da variedade BRS330, resultaram em calos de caráter heterogêneo que apresentavam diminutas porções friáveis. Todavia, mesmo quando estas porções foram transferidas para meio líquido, as células apresentaram alta taxa de oxidação, o que impediu o real estabelecimento das suspensões celulares. De fato, a produção de compostos fenólicos foi uma das principais barreiras no estabelecimento tanto dos calos friáveis quanto das culturas de células em suspensão em sorgo. A utilização de compostos como asparagina, prolina e carvão ativado minimizaram a oxidação celular, mas não foram capazes de evitar completamente o processo. Assim, grandes dificuldades foram encontradas na cultura de tecidos de sorgo, impossibilitando o estabelecimento efetivo das suspensões celulares e a continuidade do trabalho com esta espécie.

O uso de *S. viridis* se mostrava uma opção interessante devido à recente sugestão desta espécie como potencial planta-modelo para gramíneas C4. Os calos de *S. viridis* foram estabelecidos a partir de embriões maduros e resultaram em calos friáveis, os quais foram utilizados no estabelecimento das culturas de suspensão celular. Ao nosso conhecimento, o trabalho aqui desenvolvido é o primeiro relatando o estabelecimento de uma cultura de suspensão em *S. viridis*, que pode ser amplamente utilizada em estudos fisiológicos e moleculares. Estas suspensões celulares foram utilizadas na tentativa de estabelecimento de culturas xilogênicas. Diversos compostos e combinações hormonais foram utilizados a fim de promover a indução da transdiferenciação de elementos traqueais. Contudo, em nenhum dos tratamentos utilizados o processo foi induzido. Urge ressaltar que mesmo os compostos indutores do processo de transdiferenciação em espécies filogeneticamente próximas (incluindo o trabalho de cana-de-açúcar aqui reportado), como os hormônios TDZ, BL e 2,4-D, não apresentaram resposta positivas em *S. viridis*. Outros compostos sintéticos, relatados como indutores da transdiferenciação

de elementos traqueais em espécies eudicotiledôneas, como BK e XY, foram testados e também não foram efetivos. Dessa forma, este trabalho reporta pela primeira vez o estabelecimento de suspensões celulares de *S. viridis*, mas os protocolos aqui testados não foram efetivos para estabelecer de culturas xilogênicas nesta espécie.

Apesar das dificuldades em se realizar estudos moleculares em cana-de-açúcar, devido ao seu genoma altamente complexo e poliploide e à ausência de ferramentas genéticas e genômicas, esta gramínea C4 é uma das principais culturas de bioenergia do mundo, tendo também grande potencial para a produção de etanol de segunda geração. Assim, existe um grande interesse no estabelecimento de ferramentas que contribuam para os estudos relacionados à parede celular secundária em cana-de-açúcar. Para esta espécie, calos friáveis foram estabelecidos a partir do palmito e permitiram o estabelecimento das suspensões celulares. Para o estabelecimento de culturas xilogênicas em cana-de-açúcar, diversos hormônios foram testados. Observou-se que ao menos dois hormônios foram requeridos para induzir o processo de transdiferenciação de elementos traqueais: (i) 2,4-D e BL; (ii) 2,4-D e TDZ; e (iii) TDZ e BL. Dentre os tratamentos utilizados, aquele contendo 2,4-D 10 μ M + BL 2,5 μ M foi o que apresentou melhor resposta, pois resultou na formação efetiva de elementos traqueais e ainda manteve a viabilidade da cultura. Assim como nos resultados obtidos em *S. viridis*, os compostos sintéticos BK e XY, sob as condições aqui testadas, não resultaram na formação de elementos traqueais. Os elementos traqueais induzidos pelo tratamento de 2,4-D 10 μ M + BL 2,5 μ M formaram-se preferencialmente nas bordas de *clusters* celulares, sugerindo que assim como em outros trabalhos, o processo de diferenciação tende a promover a diferenciação de células vizinhas (Motose et al., 2001). As análises de microscopia confocal revelaram que os elementos traqueais formados apresentavam padrões reticulado e pontado de deposição de parede celular secundária, ambos observados também nas análises *in vivo*. A cultura xilogênica estabelecida foi subsequentemente caracterizada para a expressão de genes envolvidos na deposição de parede celular secundária e para a deposição de lignina. Constatou-se por meio de RT-qPCR que ao longo do processo de transdiferenciação houve um significativo aumento na expressão dos genes de metabolismo de parede celular e lignina, como *C3H*, *4CL*, *COMT*, *F5H*, *CCoAOMT*, *CesA9* e *CesA12*. Ademais, observou-se um aumento significativo no conteúdo de lignina ao longo de quatro semanas de tratamento com 2,4-D 10 μ M + BL 2,5 μ M. Assim, os dados morfológicos sobre o padrão de deposição de parede celular, as

análises de expressão gênica e o aumento no conteúdo de lignina evidenciam que a cultura xilogênica em cana-de-açúcar foi de fato bem estabelecida, tornando-se uma importante ferramenta no estudo de parede secundária em gramíneas C4. Juntamente com o estabelecimento da cultura xilogênica, um sistema de protoplastos foi estabelecido a partir da digestão de suspensões celulares com uma combinação de celulase e macerozyme. O protocolo de transfecção desenvolvido resultou em até 17,80 % de protoplastos transfectados, quando a solução de incubação não era suplementada com CaCl_2 . Assim, conclui-se que a contribuição deste projeto de mestrado se dá pelo desenvolvimento de ferramentas que permitirão estudos moleculares mais detalhados sobre a deposição de parede celular secundária em gramíneas C4, que são proeminentes culturas para a bioeconomia.

7 BIBLIOGRAFIA

- Abramson M, Shoseyov O, Hirsch S, Shani Z** (2013) Genetic Modifications of Plant Cell Walls to Increase Biomass and Bioethanol Production. *Adv. Biofuels Bioprod.* Springer, New York, NY, pp 315–338
- Acosta Sanchez D** (2004) White food-type sorghum in direct-expansion extrusion applications. Texas A&M University
- Aden A, Ruth M, Ibsen K, Jechura J, Neeves K, Sheehan J, Wallace B, Montague L, Slayton A, Lukas J** (2002) Lignocellulosic Biomass to Ethanol Process Design and Economics Utilizing Co-Current Dilute Acid Prehydrolysis and Enzymatic Hydrolysis for Corn Stover. NATIONAL RENEWABLE ENERGY LAB GOLDEN CO, NATIONAL RENEWABLE ENERGY LAB GOLDEN CO
- Al-Mamary M, Molham A-H, Abdulwali A-A, Al-Obeidi A** (2001) In vivo effects of dietary sorghum tannins on rabbit digestive enzymes and mineral absorption. *Nutr Res* **21**: 1393–1401
- Aloni R** (1993) The Role of Cytokinin in Organised Differentiation of Vascular Tissues. *Funct Plant Biol* **20**: 601–608
- Andrade S de** (2002) Principios da cultura de tecidos vegetais. - Portal Embrapa. <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/546466/principios-da-cultura-de-tecidos-vegetais>
- Awika JM, McDonough CM, Rooney LW** (2005) Decorticating sorghum to concentrate healthy phytochemicals. *J Agric Food Chem* **53**: 6230–6234
- Awika JM, Yang L, Browning JD, Faraj A** (2009) Comparative antioxidant, antiproliferative and phase II enzyme inducing potential of sorghum (*Sorghum bicolor*) varieties. *LWT - Food Sci Technol* **42**: 1041–1046
- Ayarza JAC, Cortez** (2007) Alternativa para aumentar a produção mundial do etanol anidro combustível no curto prazo : o potencial dos meios da cana.
- Baron-Epel O, Gharyal PK, Schindler M** (1988) Pectins as mediators of wall porosity in soybean cells. *Planta* **175**: 389–395
- Bell CD, Soltis DE, Soltis PS** (2010) The age and diversification of the angiosperms re-revisited. *Am J Bot* **97**: 1296–1303
- Boerjan W, Ralph J, Baucher M** (2003) Lignin Biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 519–546
- Bottcher A, Cesarino I, Santos AB dos, Vicentini R, Mayer JLS, Vanholme R, Morreel K, Goeminne G, Moura JCMS, Nobile PM, et al** (2013) Lignification in sugarcane: biochemical characterization, gene discovery, and expression analysis in two genotypes contrasting for lignin content. *Plant Physiol* **163**: 1539–1557
- Brandão RL, Abreu MC, Petrillo CP, Coelho GTCP, Scharffert RE, Carneiro NP, Carneiro AA** (2005) Regeneração em Cultura de Tecido de Cultivares de *Sorghum bicolor* através de Organogênese. <https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=pc&id=489279&biblioteca=vazio&busca=autor%22BRANDAO,%20R.%20L.%22&qFacets=autor%22BRANDAO,%20R.%20L.%22&sort=&paginaAtual=1>
- Brandão RL, Carneiro NP, Oliveira AC de, Coelho GTCP, Carneiro AA** (2012) Genetic Transformation of Immature Sorghum Inflorescence via Microprojectile Bombardment. doi: 10.5772/33627

- Brkljacic J, Grotewold E, Scholl R, Mockler T, Garvin DF, Vain P, Brutnell T, Sibout R, Bevan M, Budak H, et al** (2011) Brachypodium as a model for the grasses: today and the future. *Plant Physiol* **157**: 3–13
- Brown PJ, Klein PE, Bortiri E, Acharya CB, Rooney WL, Kresovich S** (2006) Inheritance of inflorescence architecture in sorghum. *Theor Appl Genet* **113**: 931–942
- Brutnell TP, Bennetzen JL, Vogel JP** (2015) Brachypodium distachyon and Setaria viridis: Model Genetic Systems for the Grasses. *Annu Rev Plant Biol* **66**: 465–485
- Brutnell TP, Wang L, Swartwood K, Goldschmidt A, Jackson D, Zhu X-G, Kellogg E, Eck JV** (2010) Setaria viridis: A Model for C4 Photosynthesis. *Plant Cell* **22**: 2537–2544
- Buckeridge M, Silva G, Cavalari A** (2008) Parede Celular In: Kerbauy, G.B. (ed). 2ed. Fisiologia Vegetal. Fisiol. Veg.
- Buckeridge MS, Pessoa dos Santos H, Tiné MAS** (2000) Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant Physiol Biochem* **38**: 141–156
- Burton RA, Shirley NJ, King BJ, Harvey AJ, Fincher GB** (2004) The CesA Gene Family of Barley. Quantitative Analysis of Transcripts Reveals Two Groups of Co-Expressed Genes. *Plant Physiol* **134**: 224–236
- Busse-Wicher M, Gomes TCF, Tryfona T, Nikolovski N, Stott K, Grantham NJ, Bolam DN, Skaf MS, Dupree P** (2014) The pattern of xylan acetylation suggests xylan may interact with cellulose microfibrils as a twofold helical screw in the secondary plant cell wall of Arabidopsis thaliana. *Plant J* **79**: 492–506
- Cai T, Daly B, Butler L** (1987) Callus induction and plant regeneration from shoot portions of mature embryos of high tannin sorghums. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **9**: 245–252
- Caldas L., Haridasan P, Ferreira ME** (1998) Meios nutritivos. In :Torres, A. C., Caldas, L. S., & Buso, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas . Brasília: Embrapa SPI: Embrapa CNPH, pp 87–132
- Calviño M, Messing J** (2012) Sweet sorghum as a model system for bioenergy crops. *Curr Opin Biotechnol* **23**: 323–329
- Carpita NC, McCann MC** (2008) Maize and sorghum: genetic resources for bioenergy grasses. *Trends Plant Sci* **13**: 415–420
- Carr TP, Weller CL, Schlegel VL, Cuppett SL, Guderian DM, Johnson KR** (2005) Grain sorghum lipid extract reduces cholesterol absorption and plasma non-HDL cholesterol concentration in hamsters. *J Nutr* **135**: 2236–2240
- Carroll A, Somerville C** (2009) Cellulosic Biofuels. *Annu Rev Plant Biol* **60**: 165–182
- Carvalho CHS, Zehr UB, Gunaratna N, Anderson J, Kononowicz HH, Hodges TK, Axtell JD** (2004) Agrobacterium-mediated transformation of sorghum: factors that affect transformation efficiency. *Genet Mol Biol* **27**: 259–269
- Carvalho JMFC, Sena SV dos A** (2007) Hibridação Somática. - Portal Embrapa. <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/277190/hibridacao-somatica>
- Casela RC, Borgonovi RA, Scharffert RE, Santos FG** (1986) Cultivares de sorgo. *Inf Agropec, BeloHorizonte* **12 (144)**: 40–42
- Castro LM de** (2009) Isolamento, cultura de protoplastos e regeneração de plantas de laranja doce (Citrus...

- Casu RE, Jarmey JM, Bonnett GD, Manners JM** (2007) Identification of transcripts associated with cell wall metabolism and development in the stem of sugarcane by Affymetrix GeneChip Sugarcane Genome Array expression profiling. *Funct Integr Genomics* **7**: 153–167
- Cesarino I, Araújo P, Júnior D, Pereira A, Mazzafera P** (2012) An overview of lignin metabolism and its effect on biomass recalcitrance. *Braz J Bot* **35**: 303–311
- Cesarino I, Araújo P, Sampaio Mayer JL, Vicentini R, Berthet S, Demedts B, Vanholme B, Boerjan W, Mazzafera P** (2013) Expression of SofLAC, a new laccase in sugarcane, restores lignin content but not S:G ratio of Arabidopsis lac17 mutant. *J Exp Bot* **64**: 1769–1781
- Cesarino I, Simões MS, Brito M dos S, Fanelli A, Silva T da F, Romanel E** (2016) Building the wall: recent advances in understanding lignin metabolism in grasses. *Acta Physiol Plant* **38**: 269
- Cheavegatti-Gianotto A, de Abreu HMC, Arruda P, Bespalhok Filho JC, Burnquist WL, Creste S, di Ciero L, Ferro JA, de Oliveira Figueira AV, de Sousa Filgueiras T, et al** (2011) Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil. *Trop Plant Biol* **4**: 62–89
- Chen F, Dixon RA** (2007) Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. *Nat Biotechnol* **25**: 759–761
- Chen MH, Wang PJ, Maeda E** (1987) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Carica papaya* L. tissue culture derived from root explants. *Plant Cell Rep* **6**: 348–351
- Chen WH, Davey MR, Power JB, Cocking EC** (1988) Sugarcane protoplasts: factors affecting division and plant regeneration. *Plant Cell Rep* **7**: 344–347
- Cherney JH, Axtell JD, Hassen MM, Anliker KS** (1988) Forage Quality Characterization of a Chemically Induced Brown-Midrib Mutant in Pearl Millet. *Crop Sci* **28**: 783–787
- Clarke MA, Godshall M.** (1988) Chemistry and Processing of Sugarbeet and Sugarcane, Volume 9 - 1st Edition. <https://www.elsevier.com/books/chemistry-and-processing-of-sugarbeet-and-sugarcane/clarke/978-0-444-43020-5>
- Cosgrove DJ** (2005) Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 850–861
- De Sutter V, Vanderhaeghen R, Tilleman S, Lammertyn F, Vanhoutte I, Karimi M, Inzé D, Goossens A, Hilson P** (2005) Exploration of jasmonate signalling via automated and standardized transient expression assays in tobacco cells. *Plant J Cell Mol Biol* **44**: 1065–1076
- Dekker J** (2003) The foxtail (*Setaria*) species-group. *Weed Sci* **51**: 641–656
- Del Rio JC, Rencoret J, Prinsen P, Martínez ÁT, Ralph J, Gutiérrez A** (2012) Structural Characterization of Wheat Straw Lignin as Revealed by Analytical Pyrolysis, 2D-NMR, and Reductive Cleavage Methods. *J Agric Food Chem* **60**: 5922–5935
- Demura T, Tashiro G, Horiguchi G, Kishimoto N, Kubo M, Matsuoka N, Minami A, Nagata-Hiwatashi M, Nakamura K, Okamura Y, et al** (2002) Visualization by comprehensive microarray analysis of gene expression programs during transdifferentiation of mesophyll cells into xylem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 15794–15799
- Devillard C, Walter C** (2014) Formation of plant tracheary elements in vitro – a review. *N Z J For Sci* **44**: 22
- D'Hont A, Grivet L, Feldmann P, Glaszmann JC, Rao S, Berding N** (1996) Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. *Mol Gen Genet MGG* **250**: 405–413

- Dias MOS, Junqueira TL, Cavalett O, Cunha MP, Jesus CDF, Rossell CEV, Maciel Filho R, Bonomi A** (2012) Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. *Bioresour Technol* **103**: 152–161
- Dillon SL, Shapter FM, Henry RJ, Cordeiro G, Izquierdo L, Lee LS** (2007) Domestication to Crop Improvement: Genetic Resources for Sorghum and Saccharum (Andropogoneae). *Ann Bot* **100**: 975–989
- Ding Z, Weissmann S, Wang M, Du B, Huang L, Wang L, Tu X, Zhong S, Myers C, Brutnell TP, et al** (2015) Identification of Photosynthesis-Associated C4 Candidate Genes through Comparative Leaf Gradient Transcriptome in Multiple Lineages of C3 and C4 Species. *PLOS ONE* **10**: e0140629
- Fahey GC, Jung HG** (1983) Lignin as a Marker in Digestion Studies: a Review. *J Anim Sci* **57**: 220–225
- Farrar JL, Hartle DK, Hargrove JL, Greenspan P** (2008) A novel nutraceutical property of select sorghum (*Sorghum bicolor*) brans: inhibition of protein glycation. *Phytother Res PTR* **22**: 1052–1056
- Ferreira S de S** (2013) Estudo do transcriptoma de genótipos ancestrais de cana-de-açúcar com enfoque em genes do metabolismo de parede celular. doi: 10.11606/T.46.2013.tde-20032014-151010
- Festucci-Buselli RA, Otoni WC, Joshi CP** (2007) Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. *Braz J Plant Physiol* **19**: 1–13
- Field CB, Campbell JE, Lobell DB** (2008) Biomass energy: the scale of the potential resource. *Trends Ecol Evol* **23**: 65–72
- Figueiredo R, Cesarino I, Mazzafera P** (2016) Suberin as an Extra Barrier to Grass Digestibility: a Closer Look to Sugarcane Forage. *Trop Plant Biol* **9**: 96–108
- Franklin GL** (1945) Preparation of Thin Sections of Synthetic Resins and Wood-Resin Composites, and a New Macerating Method for Wood: Abstract: Nature. <http://www.nature.com/nature/journal/v155/n3924/abs/155051a0.html>
- Fry SC** (2004) Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. *New Phytol* **161**: 641–675
- Fukuda H** (1997) Tracheary Element Differentiation. *Plant Cell* **9**: 1147–1156
- Fukuda H** (2004) Signals that control plant vascular cell differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 379–391
- Fukuda H** (1992) Tracheary Element Formation as a Model System of Cell Differentiation. *Int Rev Cytol* **136**: 289–332
- Fukuda H** (2010) Plant Tracheary Elements. *Encycl Life Sci*. doi: 10.1002/9780470015902.a0001814.pub2
- Fukuda H, Komamine A** (1980a) Establishment of an Experimental System for the Study of Tracheary Element Differentiation from Single Cells Isolated from the Mesophyll of *Zinnia elegans*. *Plant Physiol* **65**: 57–60
- Fukuda H, Komamine A** (1980b) Direct Evidence for Cytodifferentiation to Tracheary Elements without Intervening Mitosis in a Culture of Single Cells Isolated from the Mesophyll of *Zinnia elegans*. *Plant Physiol* **65**: 61–64

- Fukushima RS, Kerley MS** (2011) Use of Lignin Extracted from Different Plant Sources as Standards in the Spectrophotometric Acetyl Bromide Lignin Method. *J Agric Food Chem* **59**: 3505–3509
- Fukushima RS, Kerley MS, Ramos MH, Porter JH, Kallenbach RL** (2015) Comparison of acetyl bromide lignin with acid detergent lignin and Klason lignin and correlation with in vitro forage degradability. *Anim Feed Sci Technol* **201**: 25–37
- Gabaldón C, López-Serrano M, Pedreño MA, Barceló AR** (2005) Cloning and Molecular Characterization of the Basic Peroxidase Isoenzyme from *Zinnia elegans*, an Enzyme Involved in Lignin Biosynthesis. *Plant Physiol* **139**: 1138–1154
- Goujon T, Ferret V, Mila I, Pollet B, Ruel K, Burlat V, Joseleau J-P, Barrière Y, Lapierre C, Jouanin L** (2003) Down-regulation of the AtCCR1 gene in *Arabidopsis thaliana*: effects on phenotype, lignins and cell wall degradability. *Planta* **217**: 218–228
- Gressel J** (2008) Transgenics are imperative for biofuel crops. *Plant Sci* **174**: 246–263
- Grivet L, Arruda P** (2002) Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 122–127
- Guerra M, Torres A, Teixeira J** (1999) Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: Torres AC; Caldas LS; Buso JA (Ed.) *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. p.533-568
- Gupta S, Khanna VK, Singh R, Garg GK** (2006) Strategies for overcoming genotypic limitations of in vitro regeneration and determination of genetic components of variability of plant regeneration traits in sorghum. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **86**: 379–388
- Gurel S, Gurel E, Kaur R, Wong J, Meng L, Tan H-Q, Lemaux PG** (2009) Efficient, reproducible *Agrobacterium*-mediated transformation of sorghum using heat treatment of immature embryos. *Plant Cell Rep* **28**: 429–444
- Harris D, Stork J, Debolt S** (2009) Genetic modification in cellulose-synthase reduces crystallinity and improves biochemical conversion to fermentable sugar. *GCB Bioenergy* **1**: 51–61
- Hayama R, Coupland G** (2004) The Molecular Basis of Diversity in the Photoperiodic Flowering Responses of *Arabidopsis* and Rice. *Plant Physiol* **135**: 677–684
- Hellwig S, Drossard J, Twyman RM, Fischer R** (2004) Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nat Biotechnol* **22**: 1415–1422
- Hosaka GK, Carrer H** (2014) Estabelecimento de protocolo de cultura de tecidos de *Sorghum bicolor*. text. Universidade de São Paulo
- Howe A, Sato S, Dweikat I, Fromm M, Clemente T** (2006) Rapid and reproducible *Agrobacterium*-mediated transformation of sorghum. *Plant Cell Rep* **25**: 784–791
- Hu W-J, Harding S, Popko J, Ralph J, Stokke D, Tsai C-J, Chiang V** (1999) Repression of Lignin Biosynthesis Promotes Cellulose Accumulation and Growth in Transgenic Trees. *Nat Biotechnol* **17**: 808–812
- Huang H-J, Ramaswamy S, Al-Dajani W, Tschirner U, Cairncross RA** (2009) Effect of biomass species and plant size on cellulosic ethanol: A comparative process and economic analysis. *Biomass Bioenergy* **33**: 234–246
- Hugot É** (1986) *Handbook of Cane Sugar Engineering*. Elsevier
- Humphreys JM, Chapple C** (2002) Rewriting the lignin roadmap. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 224–229

- Hunt HV, Vander Linden M, Liu X, Motuzaite-Matuzeviciute G, Colledge S, Jones MK** (2008) Millets across Eurasia: chronology and context of early records of the genera *Panicum* and *Setaria* from archaeological sites in the Old World. *Veg Hist Archaeobotany* **17**: 5–18
- Iakimova ET, Woltering EJ** (2017) Xylogenesis in zinnia (*Zinnia elegans*) cell cultures: unravelling the regulatory steps in a complex developmental programmed cell death event. *Planta* **245**: 681–705
- Iskandar HM, Simpson RS, Casu RE, Bonnett GD, Maclean DJ, Manners JM** (2004) Comparison of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression in sugarcane. *Plant Mol Biol Report* **22**: 325–337
- Iwasaki T, Shibaoka H** (1991) Brassinosteroids Act as Regulators of Tracheary-Element Differentiation in Isolated Zinnia Mesophyll Cells. *Plant Cell Physiol* **32**: 1007–1014
- Jacobsen KR, Fisher DG, Maretzki A, Moore PH** (1992) Developmental Changes in the Anatomy of the Sugarcane Stem in Relation to Phloem Unloading and Sucrose Storage. *Bot Acta* **105**: 70–80
- Johansen DA** (1940) *Plant microtechnique*. New York
- John CR, Smith-Unna RD, Woodfield H, Covshoff S, Hibberd JM** (2014) Evolutionary convergence of cell-specific gene expression in independent lineages of C4 grasses. *Plant Physiol* **165**: 62–75
- Jung JH, Fouad WM, Vermerris W, Gallo M, Altpeter F** (2012) RNAi suppression of lignin biosynthesis in sugarcane reduces recalcitrance for biofuel production from lignocellulosic biomass. *Plant Biotechnol J* **10**: 1067–1076
- Kärkönen A, Koutaniemi S** (2010) Lignin Biosynthesis Studies in Plant Tissue Cultures. *J Integr Plant Biol* **52**: 176–185
- Kawata S, Ishihara A** (1968) The Regeneration of Rice Plant, *Oryza sativa* L., in the Callus Derived from the Seminal Root. *Proc Jpn Acad* **44**: 549–553
- Kellogg EA** (1998) Relationships of cereal crops and other grasses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 2005–2010
- Kellogg EA** (2001) Evolutionary History of the Grasses. *Plant Physiol* **125**: 1198–1205
- Kim S, Dale BE** (2004) Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass Bioenergy* **26**: 361–375
- Klercker JA** (1982) Eine methode zur isolierung lebender protoplasten. *Swenska Vet Akad Forth Stockh* **9**: 463–471
- Kobayashi S, Uchimiya H, Ikeda I** (1983) Plant Regeneration from “Trovita” Orange Protoplasts. *Jpn J Breed* **33**: 119–122
- Kondo Y, Fujita T, Sugiyama M, Fukuda H** (2015) A Novel System for Xylem Cell Differentiation in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* **8**: 612–621
- Kondo Y, Fukuda H** (2015) The TDIF signaling network. *Curr Opin Plant Biol* **28**: 106–110
- Kondo Y, Ito T, Nakagami H, Hirakawa Y, Saito M, Tamaki T, Shirasu K, Fukuda H** (2014) Plant GSK3 proteins regulate xylem cell differentiation downstream of TDIF-TDR signalling. *Nat Commun* **5**: 3504
- Kraus J, Arduin M** (1997) *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. EDUR, Seropédica, São Paulo

- Kumar V, Campbell LM, Rathore KS** (2011) Rapid recovery- and characterization of transformants following *Agrobacterium*-mediated T-DNA transfer to sorghum. *Plant Cell Tissue Organ Cult PCTOC* **104**: 137–146
- Lacayo CI, Malkin AJ, Holman H-YN, Chen L, Ding S-Y, Hwang MS, Thelen MP** (2010) Imaging Cell Wall Architecture in Single *Zinnia elegans* Tracheary Elements. *Plant Physiol* **154**: 121–133
- Lakshmi KB, Vimala V** (1996) Hypoglycemic effect of selected sorghum recipes. *Nutr Res* **16**: 1651–1658
- Lameira OA, Pinto JEBP, Cardoso MG, Arrigoni-Blank MF** (2009) Establishment of cell suspension cultures and flavonoid identification in *Cordia verbenacea* DC. *Rev Bras Plantas Med* **11**: 7–11
- Leme JJ, Borges JM** (1985) Açúcar de Cana. <https://www.estantevirtual.com.br/b/leme-junior-jorge-e-jose-marcondes-borges/acucar-de-cana/1806346246>
- Li HW, Li CH, Pao WK** (1945) Cytological and genetical studies of the interspecific cross of the cultivated foxtail millet, *Setaria italica* (L.) beauv., and the green foxtail millet, *S. viridis* L. *J. Am. Soc. Agron.*
- Li P, Brutnell TP** (2011a) *Setaria viridis* and *Setaria italica*, model genetic systems for the Panicoid grasses. *J Exp Bot* **62**: 3031–3037
- Li P, Brutnell TP** (2011b) *Setaria viridis* and *Setaria italica*, model genetic systems for the Panicoid grasses. *J Exp Bot* **62**: 3031–3037
- Lima MAC, Garcia RDO, Martins GS, Mansur E** (2001) Morfogenese in vitro e susceptibilidade de calos de variedades nacionais de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) a agentes seletivos utilizados em sistemas de transformação genética. *Braz J Bot* **24**: 73–77
- Liu G, Godwin ID** (2012) Highly efficient sorghum transformation. *Plant Cell Rep* **31**: 999–1007
- Loqué D, Scheller HV, Pauly M** (2015) Engineering of plant cell walls for enhanced biofuel production. *Curr Opin Plant Biol* **25**: 151–161
- Luque R, Sousa HC de, Kraus JE** (1996) Staining methods of modified Roeser (1972) and Kropp (1972), aiming at substituting the astra blue by alcian blue 8GS or 8GX. *Acta Bot Bras* **10**: 199–212
- Macedo AF, Silveira V** (2010) Metabolismo de poliaminas durante a embriogênese somática de cana-de-açúcar. text. Universidade de São Paulo
- Magalhães PC, Durães FOM, Scharffert RE** (2000) Fisiologia da planta sorgo. Sete Lagoas MG Embrapa Milho E Sorgo **Circular técnica**: 46
- Mantell SH, Matthews JA, Mackee RA** (1994) Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas. *Revista Brasileira de Genética*
- Marriott PE, Gómez LD, McQueen-Mason SJ** (2016) Unlocking the potential of lignocellulosic biomass through plant science. *New Phytol* **209**: 1366–1381
- Martin AP, Palmer WM, Brown C, Abel C, Lunn JE, Furbank RT, Grof CPL** (2016) A developing *Setaria viridis* internode: an experimental system for the study of biomass generation in a C4 model species. *Biotechnol Biofuels* **9**: 45
- Martins PK, Mafra V, de Souza WR, Ribeiro AP, Vinecky F, Basso MF, da Cunha BADB, Kobayashi AK, Molinari HBC** (2016) Selection of reliable reference genes for RT-qPCR analysis during developmental stages and abiotic stress in *Setaria viridis*. *Sci Rep*. doi: 10.1038/srep28348

- Martins PK, Nakayama TJ, Ribeiro AP, Cunha BADB da, Nepomuceno AL, Harmon FG, Kobayashi AK, Molinari HBC** (2015) *Setaria viridis* floral-dip: A simple and rapid *Agrobacterium*-mediated transformation method. *Biotechnol Rep Amst Neth* **6**: 61–63
- Mazarei M, Al-Ahmad H, Rudis MR, Joyce BL, Stewart CN** (2011) Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) cell suspension cultures: Establishment, characterization, and application. *Plant Sci Int J Exp Plant Biol* **181**: 712–715
- McCann MC** (1997) Tracheary element formation: building up to a dead end. *Trends Plant Sci* **2**: 333–338
- Milhinhos A, Miguel CM** (2013) Hormone interactions in xylem development: a matter of signals. *Plant Cell Rep* **32**: 867–883
- Milioni D, Sado PE, Stacey NJ, Domingo C, Roberts K, McCann MC** (2001) Differential expression of cell-wall-related genes during the formation of tracheary elements in the *Zinnia* mesophyll cell system. *Plant Mol Biol* **47**: 221–238
- Milioni D, Sado P-E, Stacey NJ, Roberts K, McCann MC** (2002) Early Gene Expression Associated with the Commitment and Differentiation of a Plant Tracheary Element Is Revealed by cDNA–Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis. *Plant Cell Online* **14**: 2813–2824
- Min D, Li Q, Jameel H, Chiang V, Chang H** (2012) The cellulase-mediated saccharification on wood derived from transgenic low-lignin lines of black cottonwood (*Populus trichocarpa*). *Appl Biochem Biotechnol* **168**: 947–955
- Morohashi K, Casas MI, Falcone Ferreyra ML, Falcone Ferreyra L, Mejía-Guerra MK, Pourcel L, Yilmaz A, Feller A, Carvalho B, Emiliani J, et al** (2012) A genome-wide regulatory framework identifies maize pericarp color1 controlled genes. *Plant Cell* **24**: 2745–2764
- Morrison IM, Stewart D** (1995) Determination of lignin in the presence of ester-bound substituted cinnamic acids by a modified acetyl bromide procedure. *J Sci Food Agric* **69**: 151–157
- Motose H, Fukuda H, Sugiyama M** (2001) Involvement of local intercellular communication in the differentiation of *zinnia* mesophyll cells into tracheary elements. *Planta* **213**: 121–131
- Motose H, Sugiyama M, Fukuda H** (2004) A proteoglycan mediates inductive interaction during plant vascular development. *Nature* **429**: 873–878
- Muir JP, Sanderson MA, Ocumpaugh WR, Jones RM, Reed RL** (2001) Biomass Production of “Alamo” Switchgrass in Response to Nitrogen, Phosphorus, and Row Spacing. *Agron J* **93**: 896–901
- Murashige T, Skoog F** (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* **15**: 473–497
- Nabors MW, Heyser JW, Dykes TA, Demott KJ** (1983) Long-duration, high-frequency plant regeneration from cereal tissue cultures. *Planta* **157**: 385–391
- Nakano J, Meshitsuka G** (1992) The Detection of Lignin. *Methods Lignin Chem*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 23–32
- Negi S, Tak H, Ganapathi TR** (2015) In vitro xylem vessel elements formation from banana embryogenic cells and expression analysis of vessel development-related genes. *Plant Biotechnol Rep* **9**: 47–54
- Novaes E, Kirst M, Chiang V, Winter-Sederoff H, Sederoff R** (2010) Lignin and Biomass: A Negative Correlation for Wood Formation and Lignin Content in Trees. *Plant Physiol* **154**: 555–561

- Novo-Uzal E, Fernández-Pérez F, Herrero J, Gutiérrez J, Gómez-Ros LV, Bernal MÁ, Díaz J, Cuello J, Pomar F, Pedreño MÁ** (2013) From Zinnia to Arabidopsis: approaching the involvement of peroxidases in lignification. *J Exp Bot* **64**: 3499–3518
- Oda Y, Mimura T, Hasezawa S** (2005) Regulation of Secondary Cell Wall Development by Cortical Microtubules during Tracheary Element Differentiation in Arabidopsis Cell Suspensions. *Plant Physiol* **137**: 1027–1036
- Ogita S, Nomura T, Kishimoto T, Kato Y** (2012) A novel xylogenic suspension culture model for exploring lignification in *Phyllostachys bamboo*. *Plant Methods* **8**: 40
- Oliveira MM** (2016) Aplicações e avanços na biotecnologia vegetal - Ensaio Universitários - Muruci. <http://www.trabalhosfeitos.com/ensaios/Aplica%C3%A7oes-e-Avan%C3%A7os-Na-Biotecnologia-Vegetal/651685.html>
- Otero M.** (2001) Las Mieles Finales de Caña – Composición, propiedades y usos.
- Pandey A, Soccol CR, Nigam P, Soccol VT** (2000) Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresour Technol* **74**: 69–80
- Papini-Terzi FS, Rocha FR, Vêncio RZN, Felix JM, Branco DS, Waclawovsky AJ, Del Bem LEV, Lembke CG, Costa MDL, Nishiyama MY, et al** (2009) Sugarcane genes associated with sucrose content. *BMC Genomics* **10**: 120
- Parrish DJ, Fike JH** (2005) The Biology and Agronomy of Switchgrass for Biofuels. *Crit Rev Plant Sci* **24**: 423–459
- Paterson AH, Bowers JE, Bruggmann R, Dubchak I, Grimwood J, Gundlach H, Haberer G, Hellsten U, Mitros T, Poliakov A, et al** (2009) The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. *Nature* **457**: 551–556
- Paterson AH, Moore PH, Tew TL** (2013) The Gene Pool of *Saccharum* Species and Their Improvement. *Genomics Saccharinae*. Springer, New York, NY, pp 43–71
- Pauly M, Keegstra K** (2008) Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *Plant J Cell Mol Biol* **54**: 559–568
- Perlack RD, Wright LL, Turhollow AF, Graham RL, Stokes BJ, Erbach DC** (2005) Biomass as Feedstock for A Bioenergy and Bioproducts Industry: The Technical Feasibility of a Billion-Ton Annual Supply. OAK RIDGE NATIONAL LAB TN, OAK RIDGE NATIONAL LAB TN
- Pesquet E, Ranocha P, Legay S, Digonnet C, Barbier O, Pichon M, Goffner D** (2005) Novel Markers of Xylogenesis in *Zinnia* Are Differentially Regulated by Auxin and Cytokinin. *Plant Physiol* **139**: 1821–1839
- Pesquet E, Zhang B, Gorzsás A, Puhakainen T, Serk H, Escamez S, Barbier O, Gerber L, Courtois-Moreau C, Alatalo E, et al** (2013) Non-cell-autonomous postmortem lignification of tracheary elements in *Zinnia elegans*. *Plant Cell* **25**: 1314–1328
- Petti C, Shearer A, Tateno M, Ruwaya M, Nokes S, Brutnell T, DeBolt S** (2013a) Comparative feedstock analysis in *Setaria viridis* L. as a model for C4 bioenergy grasses and Panicoid crop species. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2013.00181
- Petti C, Shearer A, Tateno M, Ruwaya M, Nokes S, Brutnell T, DeBolt S** (2013b) Comparative feedstock analysis in *Setaria viridis* L. as a model for C4 bioenergy grasses and Panicoid crop species. *Front Plant Sci* **4**: 181
- Piperidis G, Piperidis N, D'Hont A** (2010) Molecular cytogenetic investigation of chromosome composition and transmission in sugarcane. *Mol Genet Genomics MGG* **284**: 65–73

- Pola S** (2011) Leaf Discs as a Source Material for Plant Tissue Culture Studies of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Not Sci Biol* **3**: 70–78
- Rabelo SC, Carrere H, Maciel Filho R, Costa AC** (2011) Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept. *Bioresour Technol* **102**: 7887–7895
- Raghuwanshi A, Birch RG** (2010) Genetic transformation of sweet sorghum. *Plant Cell Rep* **29**: 997–1005
- Rakshit S, Rashid Z, Sekhar JC, Fatma T, Dass S** (2010) Callus induction and whole plant regeneration in elite Indian maize (*Zea mays* L.) inbreds. *Plant Cell Tissue Organ Cult*.
- Ralph J, Lundquist K, Brunow G, Lu F, Kim H, Schatz PF, Marita JM, Hatfield RD, Ralph SA, Christensen JH, et al** (2004) Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl- propanoids. *Phytochem Rev* **3**: 29–60
- Ramachandra Rao S, Ravishankar GA** (2002) Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol Adv* **20**: 101–153
- Rao AM, Kishor PB, Reddy LA, Vaidyanath K** (1988) Callus induction and high frequency plant regeneration in Italian millet (*Setaria italica*). *Plant Cell Rep* **7**: 557–559
- Reiter WD** (2002) Biosynthesis and properties of the plant cell wall. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 536–542
- Riboulet C, Guillaumie S, Méchin V, Bosio M, Pichon M, Goffner D, Lapierre C, Pollet B, Lefevre B, Martinant JP, et al** (2009) Kinetics of Phenylpropanoid Gene Expression in Maize Growing Internodes: Relationships with Cell Wall Deposition. *Crop Sci* **49**: 211–223
- Ricaud C, Egan B., Gilaspie A., Hughes C.** (1989) *Diseases of Sugarcane - Major Diseases*, 1st Edition. Elsevier Science
- Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D** (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* **57**: 929–967
- Rogers LA, Dubos C, Cullis IF, Surman C, Poole M, Willment J, Mansfield SD, Campbell MM** (2005) Light, the circadian clock, and sugar perception in the control of lignin biosynthesis. *J Exp Bot* **56**: 1651–1663
- Rubin EM** (2008) Genomics of cellulosic biofuels. *Nature* **454**: 841–845
- Saballos A** (2008) Development and utilization of sorghum as a bioenergy crop. Vermerris W Ed *Genet. Improv. Bioenergy Crops*. Springer, New York, NY, pp 211–248
- Saballos A, Vermerris W, Rivera L, Ejeta G** (2008) Allelic Association, Chemical Characterization and Saccharification Properties of brown midrib Mutants of Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *BioEnergy Res* **1**: 193–204
- Saha P, Blumwald E** (2016) Spike-dip transformation of *Setaria viridis*. *Plant J Cell Mol Biol* **86**: 89–101
- Sai Kishore N, Visarada KBRS, Aravinda Lakshmi Y, Pashupatinath E, Rao SV, Seetharama N** (2006) In vitro culture methods in sorghum with shoot tip as the explant material. *Plant Cell Rep* **25**: 174–182
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T** (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*., 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sanderson MA, Adler PR** (2008) Perennial Forages as Second Generation Bioenergy Crops. *Int J Mol Sci* **9**: 768–788

- Sattler SE, Saballos A, Xin Z, Funnell-Harris DL, Vermerris W, Pedersen JF** (2014) Characterization of Novel Sorghum brown midrib Mutants from an EMS-Mutagenized Population. *G3 GenesGenomesGenetics* **4**: 2115–2124
- Scheller HV, Ulvskov P** (2010) Hemicelluloses. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 263–289
- Sewalt V, Ni W, Blount JW, Jung HG, Masoud SA, Howles PA, Lamb C, Dixon RA** (1997) Reduced Lignin Content and Altered Lignin Composition in Transgenic Tobacco Down-Regulated in Expression of L-Phenylalanine Ammonia-Lyase or Cinnamate 4-Hydroxylase. *Plant Physiol* **115**: 41–50
- Shakoor N, Nair R, Crasta O, Morris G, Feltus A, Kresovich S** (2014) A Sorghum bicolor expression atlas reveals dynamic genotype-specific expression profiles for vegetative tissues of grain, sweet and bioenergy sorghums. *BMC Plant Biol* **14**: 35
- Shen H, Mazarei M, Hisano H, Escamilla-Trevino L, Fu C, Pu Y, Rudis MR, Tang Y, Xiao X, Jackson L, et al** (2013) A genomics approach to deciphering lignin biosynthesis in switchgrass. *Plant Cell* **25**: 4342–4361
- Shrawat AK, Lörz H** (2006) Agrobacterium-mediated transformation of cereals: a promising approach crossing barriers. *Plant Biotechnol J* **4**: 575–603
- Smith R** (2013) *Plant Tissue Culture - 3rd Edition*. <https://www.elsevier.com/books/plant-tissue-culture/smith/978-0-12-415920-4>
- Smith SA, Beaulieu JM, Donoghue MJ** (2010) An uncorrelated relaxed-clock analysis suggests an earlier origin for flowering plants. *Proc Natl Acad Sci* **107**: 5897–5902
- Souza A de, Moraes MG de, Ribeiro R de CLF** (2005) Gramíneas do cerrado: carboidratos não-estruturais e aspectos ecofisiológicos. *Acta Bot Bras* **19**: 81–90
- Spencer E., Meade G.** (1967) *Manual del azucar de caña*. **Cap.11**: 1204
- Sticklen MB** (2008) Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. *Nat Rev Genet* **9**: 433–443
- Taiz L, Zeiger E** (2006) *Fisiología vegetal*. Universitat Jaume I
- Tammisola J** (2010) Towards much more efficient biofuel crops - can sugarcane pave the way? *GM Crops* **1**: 181–198
- Taylor NG, Howells RM, Huttly AK, Vickers K, Turner SR** (2003) Interactions among three distinct CesaA proteins essential for cellulose synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 1450–1455
- Taylor NG, Laurie S, Turner SR** (2000) Multiple cellulose synthase catalytic subunits are required for cellulose synthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **12**: 2529–2540
- Turner S, Gallois P, Brown D** (2007) Tracheary element differentiation. *Annu Rev Plant Biol* **58**: 407–433
- Twumasi P, Iakimova ET, Qian T, van Ieperen W, Schel JH, Emons AM, van Kooten O, Woltering EJ** (2010) Caspase inhibitors affect the kinetics and dimensions of tracheary elements in xylogenetic Zinnia (*Zinnia elegans*) cell cultures. *BMC Plant Biol* **10**: 162
- Van Acker R, Leplé J-C, Aerts D, Storme V, Goeminne G, Ivens B, Légée F, Lapierre C, Piens K, Van Montagu MCE, et al** (2014) Improved saccharification and ethanol yield from field-grown transgenic poplar deficient in cinnamoyl-CoA reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 845–850

- Van Acker R, Vanholme R, Storme V, Mortimer JC, Dupree P, Boerjan W** (2013) Lignin biosynthesis perturbations affect secondary cell wall composition and saccharification yield in *Arabidopsis thaliana*. *Biotechnol Biofuels* **6**: 46
- Vanden Bossche R, Demedts B, Vanderhaeghen R, Goossens A** (2013) Transient expression assays in tobacco protoplasts. *Methods Mol Biol Clifton NJ* **1011**: 227–239
- Vanholme B, Desmet T, Ronsse F, Rabaey K, Breusegem FV, Mey MD, Soetaert W, Boerjan W** (2013) Towards a carbon-negative sustainable bio-based economy. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2013.00174
- Vanholme R, Morreel K, Darrah C, Oyarce P, Grabber JH, Ralph J, Boerjan W** (2012) Metabolic engineering of novel lignin in biomass crops. *New Phytol* **196**: 978–1000
- Vanholme R, Van Acker R, Boerjan W** (2010) Potential of *Arabidopsis* systems biology to advance the biofuel field. *Trends Biotechnol* **28**: 543–547
- Verdeil J-L, Alemanno L, Niemenak N, Tranbarger TJ** (2007) Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? *Trends Plant Sci* **12**: 245–252
- Vermerris W** (2011a) Survey of genomics approaches to improve bioenergy traits in maize, sorghum and sugarcane. *J Integr Plant Biol* **53**: 105–119
- Vermerris W** (2011b) Survey of genomics approaches to improve bioenergy traits in maize, sorghum and sugarcane. *J Integr Plant Biol* **53**: 105–119
- Vettore AL, da Silva FR, Kemper EL, Souza GM, da Silva AM, Ferro MIT, Henrique-Silva F, Gigliotti EA, Lemos MVF, Coutinho LL, et al** (2003) Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. *Genome Res* **13**: 2725–2735
- Vogel J** (2008) Unique aspects of the grass cell wall. *Curr Opin Plant Biol* **11**: 301–307
- Vogel J, Hill T** (2008) High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brachypodium distachyon* inbred line Bd21-3. *Plant Cell Rep* **27**: 471–478
- Wet JMJD, Harlan JR** (1975) Weeds and Domesticates: Evolution in the man-made habitat. *Econ Bot* **29**: 99–108
- Willats WG, Orfila C, Limberg G, Buchholt HC, van Alebeek GJ, Voragen AG, Marcus SE, Christensen TM, Mikkelsen JD, Murray BS, et al** (2001) Modulation of the degree and pattern of methyl-esterification of pectic homogalacturonan in plant cell walls. Implications for pectin methyl esterase action, matrix properties, and cell adhesion. *J Biol Chem* **276**: 19404–19413
- Wyman CE, Spindler DD, Grohmann K** (1992) Simultaneous saccharification and fermentation of several lignocellulosic feedstocks to fuel ethanol. *Biomass Bioenergy* **3**: 301–307
- Xu B, Escamilla-Treviño LL, Sathitsuksanoh N, Shen Z, Shen H, Percival Zhang Y-H, Dixon RA, Zhao B** (2011) Silencing of 4-coumarate:coenzyme A ligase in switchgrass leads to reduced lignin content and improved fermentable sugar yields for biofuel production. *New Phytol* **192**: 611–625
- Xu J, Li Y, Ma X, Ding J, Wang K, Wang S, Tian Y, Zhang H, Zhu X-G** (2013) Whole transcriptome analysis using next-generation sequencing of model species *Setaria viridis* to support C4 photosynthesis research. *Plant Mol Biol* **83**: 77–87
- Yamamoto R, Demura T, Fukuda H** (1997) Brassinosteroids induce entry into the final stage of tracheary element differentiation in cultured *Zinnia* cells. *Plant Cell Physiol* **38**: 980–983

- Yang L, Browning JD, Awika JM** (2009) Sorghum 3-deoxyanthocyanins possess strong phase II enzyme inducer activity and cancer cell growth inhibition properties. *J Agric Food Chem* **57**: 1797–1804
- Yokoyama R, Nishitani K** (2004) Genomic basis for cell-wall diversity in plants. A comparative approach to gene families in rice and Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **45**: 1111–1121
- Yoshimoto K, Takamura H, Kadota I, Motose H, Takahashi T** (2016) Chemical control of xylem differentiation by thermospermine, xylemin, and auxin. *Sci Rep* **6**: 21487
- Yuan JS, Tiller KH, Al-Ahmad H, Stewart NR, Stewart CN** (2008) Plants to power: bioenergy to fuel the future. *Trends Plant Sci* **13**: 421–429
- Zhao ZY, Cai T, Tagliani L, Miller M, Wang N, Pang H, Rudert M, Schroeder S, Hondred D, Seltzer J, et al** (2000) Agrobacterium-mediated sorghum transformation. *Plant Mol Biol* **44**: 789–798
- Zhong R, Morrison WH, Himmelsbach DS, Poole FL, Ye ZH** (2000) Essential role of caffeoyl coenzyme A O-methyltransferase in lignin biosynthesis in woody poplar plants. *Plant Physiol* **124**: 563–578
- Zhong R, Ye Z-H** (2015) Secondary cell walls: biosynthesis, patterned deposition and transcriptional regulation. *Plant Cell Physiol* **56**: 195–214
- Zhong R, Ye Z-H** (2009) Secondary Cell Walls. *Encycl Life Sci*. doi: 10.1002/9780470015902.a0021256
- Zhu JY, Pan XJ** (2010) Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: Technology and energy consumption evaluation. *Bioresour Technol* **101**: 4992–5002

ERRATA

Cultura de células em suspensão como ferramenta para estudos em parede celular secundária em gramíneas C4

Suspension cell culture as a tool for secondary cell wall studies in C4 grasses

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em ciências, na Área de Biologia de Sistemas

São Paulo. Novembro de 2017

ERRATA

Cultura de células em suspensão como ferramenta para estudos em parede celular secundária em gramíneas C4

Suspension cell culture as a tool for secondary cell wall studies in C4 grasses

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em ciências, na Área de Biologia de Sistemas

São Paulo. Novembro de 2017

ERRATA

Cultura de células em suspensão como ferramenta para estudos em parede celular secundária em gramíneas C4

Suspension cell culture as a tool for secondary cell wall studies in C4 grasses

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em ciências, na Área de Biologia de Sistemas

São Paulo. Novembro de 2017