

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

Cultura de tecidos e transformação genética de cana-energia visando estabilidade
genética de transgenes

Aline Araujo Politano

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

Piracicaba
2021

Aline Araujo Politano
Tecnóloga em Biocombustíveis

Cultura de tecidos e transformação genética de cana-energia visando a estabilidade genética de transgene

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:
Prof^ª. Dr^ª. **HELAINÉ CARRER**

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

Piracicaba
2021

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

Politano, Aline Araujo

Cultura de tecidos e transformação genética de cana-energia visando estabilidade genética de transgenes / Aline Araujo Politano. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011.- - Piracicaba, 2021.

65 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. *Saccharum spontaneum* 2. Embriogênese somática 3. Transformação genética de plantas 4. Biolística 5. *Agrobacterium tumefaciens* 6. Gene *DDM1* 7. Gene *AtBI-1* 8. Metilação de DNA I. Título

Aos meus pais Santina e Eugenio por todo apoio que recebo durante todo esse período de evolução da minha vida,

Ao meu irmão, que mesmo pela distância está sempre nos meus pensamentos,

A todos os amigos que tornaram essa trajetória mais leve com momentos de alegrias.

Dedico!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois foi em Ti que encontrei forças nos momentos de fraquezas e dificuldades.

A professora Dr^a. Helaine Carrer por ter acreditado e confiado em mim durante esses cinco anos que foi minha trajetória no CEBTEC, agradeço pelos conselhos que me ajudaram amadurecer, pela oportunidade e amizade.

À Empresa GranBio/Biocelere por disponibilizar as variedades de Cana-energia utilizadas neste trabalho e ao Dr^o José Bressiani pela confiança em mim e pela oportunidade de participar do projeto da cana-energia, obrigada.

A Msc. Valentina Fátima de Martin por toda ajuda dada para encontrar soluções para os problemas técnicos no desenvolvimento da minha pesquisa, agradeço pela amizade e pelos conselhos profissionais e pessoais.

Ao Dr^o Ênio Thiago de Oliveira por todo apoio no desenvolvimento das atividades relacionadas a minha pesquisa, principalmente na coleta de cana-energia no campo foi de grande ajuda, agradeço pela amizade.

A Maria Solizete G. Silva, secretária do PPG em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, por ter auxiliado tantas vezes.

As amigas que ganhei no laboratório Juliana Verissimo, Gabriel Moreira, Perla Oliveira, Fernando Matias, Máisa Siqueira, Olman, Ingrid e Akemi, agradeço pelas conversas, pelas contribuições e ajudas, por tornar os momentos mais leves.

As estagiárias Leticia, Taina, Wendyla, Fernanda, entre tantos outros que contribuíram com esse projeto, agradeço pela amizade.

A agência de fomento CNPq pela bolsa concedida.

A Associação Brasileira de Gestão em Projetos pela bolsa concedida.

E a todas as pessoas que colaboraram indiretamente com esse trabalho e não foram citadas,
agradeço!

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. Cana-energia	15
2.2. Cultura de tecidos	16
2.3. Gene DDM1	16
2.4. Gene AtBI-1	17
3. OBJETIVOS	19
3.1. Objetivo geral.....	19
3.2. Objetivos específicos.....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1. Material vegetal.....	21
4.2. Cultura de tecidos de cana-energia.....	21
4.3. Transformação genética.....	23
4.3.1. Método de biolística	23
4.3.2. Via Agrobacterium tumefaciens	24
4.4. Identificação das plantas transgênicas por PCR.....	25
4.4.1. Confirmação de plantas transformadas com o gene DDM1	25
4.4.2. Confirmação de plantas transformadas com o gene AtBI-1	27
4.4.3. Análise de PCR para o gene virG	27
4.5. Retransformação de plantas transgênicas para o gene DDM1	27
4.6. Análise de expressão dos genes DDM1 e do retrotransposon TE010.....	28
4.7. Normalização e análise de expressão do gene GAPDH	28
4.8. Análise de expressão por RT-qPCR.....	28
4.9. Análise de metilação do elemento de transposição TE010	29
4.1. Sequenciamento do elemento de transposição TE010 tratado com bissulfito	30
4.2. Análise estatística	30
5. RESULTADOS.....	31
5.1. Cultura de tecidos	31

5.1.1. Geração de calos embriogênicos da cana-energia	31
5.1.2. Oxidação de calos na cultura de tecidos	32
5.1.3. Regeneração de plantas.....	33
5.2. Transformação genética de cana-energia	34
5.2.1. Transformação por biolística com o gene DDM1	34
5.2.2. Transformação via <i>Agrobacterium</i> com o gene AtBI-1	37
5.2.3. Retransformação das plantas com o gene DDM1 via <i>Agrobacterium</i> com o gene AtBI-1.....	39
5.3. Avaliação da expressão do gene DDM1 e do elemento de transposição TE010.....	40
5.4. Avaliação da qualidade do cDNA com o gene GAPDH	41
5.5. Expressão do gene DDM1 e do TE010 em RT-qPCR	41
5.6. Avaliação da metilação do elemento de transposição TE010.....	46
6. DISCUSSÃO	49
6.1. Desenvolvimento, oxidação e regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos de cana-energia	49
6.2. Transformação genética de calos embriogênicos e regeneração de plantas	50
6.3. Expressão do gene <i>DDM1</i> visando estabilidade de transgene.....	51
6.4. Metilação do elemento de transposição TE010	52
7. CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	57

RESUMO

Cultura de tecidos e transformação genética de cana-energia visando estabilidade genética de transgenes

A cana-energia é uma cultura de grande valor econômico utilizada como matéria prima na produção de etanol e bioeletricidade. Devido sua alta produção de biomassa é considerada uma alternativa renovável para substituir os combustíveis fósseis. O melhoramento genético convencional tem sido a base para obtenção de novas variedades, e mais recentemente, técnicas biotecnológicas e de engenharia genética têm contribuído com a introdução de novas características em variedades selecionadas. Entretanto, são relatadas dificuldades em se produzir plantas transgênicas estáveis tanto pela complexidade do genoma por ser poliplóide como também pela tecnologia de transformação genética ser dependente da etapa de cultura de tecidos para regeneração de plantas. Estudos demonstraram que calos embriogênicos apresentam alta atividade de elementos de transposição com alto potencial de variação somaclonal. Desde que a regeneração de plantas *in vitro* é uma etapa essencial no processo de transformação genética, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de obtenção de cana-energia transformada geneticamente com o transgene *DDM1* que apresenta a função putativa de silenciar atividade de elementos de transposição. No total, seis variedades de cana-energia (Vx12-1003, Vx12-1744, Vx12-1191, Vx12-0277, Vx12-1658 e Vx12-1022) foram escolhidas para testar a capacidade de formação de calos embriogênicos e regeneração de plantas. As variedades Vx12-1003, Vx12-1744, Vx12-1191 e Vx12-0277 apresentaram eficiência de regeneração de plantas entre 63% a 90%. Experimentos de transformação genética pelo método de biolística com o gene *DDM1* resultou em três eventos para a variedade Vx12-1003 e quatro eventos para a variedade Vx12-0277. Também foram confirmados 22 eventos de transformação via *Agrobacterium* utilizando a variedade Vx12-1744 com o gene *AtBI-1*. Este gene já foi demonstrado conferir tolerância ao déficit hídrico em cana-de-açúcar e assim foi escolhido para transformar cana-energia. Análise de expressão do gene *DDM1* e do retrotransposon TE010 por RT-qPCR nas fases de formação dos calos embriogênicos até plantas nos eventos transgênicos da variedade Vx12-0277 demonstrou expressão significativa do gene *DDM1* na fase inicial de formação de calos. Para confirmar se o gene *DDM1* teria influência na redução da atividade do retrotransposon TE010, foi avaliado sua taxa de metilação por sequenciamento do DNA tratado com bissulfito. Os resultados mostraram que os eventos transgênicos apresentaram maior nível de metilação. Assim, este estudo demonstrou que cana energia é capaz de produzir plantas transgênicas e o gene *DDM1* reduziu o nível de expressão do elemento de transposição TE010, com potencial de aumentar a estabilidade de transgene no genoma.

Palavras-chave: *Saccharum spontaneum*, Embriogênese somática, Biolística, *Agrobacterium tumefaciens*, Gene *DDM1*, Gene *AtBI-1*, Metilação de DNA, Elemento de transposição

ABSTRACT

Tissue culture and sugarcane genetic transformation for genetic stability of transgenes

Energy cane is a crop of great economic value used as a raw material in the production of ethanol and bioelectricity. Due to its high biomass production, it is considered a renewable alternative to replace fossil fuels. Breeding by conventional method has been the basis for obtaining new varieties, and more recently, biotechnological and genetic engineering techniques have contributed to the introduction of new characteristics in selected varieties. However, it is reported that there are difficulties to produce stable transgenic sugarcane plants due the complexity of the genome in being polyploid and also because the genetic transformation technology is dependent on the tissue culture stage for plant regeneration. Studies have shown that embryogenic callus have a high activity of transposition elements with a high potential to produce somaclonal variation. Since *in vitro* plant regeneration has been an essential step in the process of genetic transformation, this work had the objective to evaluate the potential to obtain genetic transformation of energy cane with the *DDM1* transgene that has the putative function of silencing the activity of transposing elements. In total, six varieties of energy cane (Vx12-1003, Vx12-1744, Vx12-1191, Vx12-0277, Vx12-1658 and Vx12-1022) were chosen to test the ability to form embryogenic callus and plant regeneration. The varieties, Vx12-1003, Vx12-1744, Vx12-1191, Vx12-0277 showed high efficiency of plant regeneration between 63% to 90%. Experiments of genetic transformation by biolistics method with the *DDM1* gene resulted in three events for the Vx12-1003 variety and four events for the Vx12-0277 variety. Also, we confirmed 22 transformation events via *Agrobacterium* using the Vx12-1744 variety with the *AtBI-1* gene. This gene was already shown to confer tolerance to water deficit in sugarcane, due to this, it was chosen to transform energy cane. The expression analysis of the *DDM1* gene and the retrotransposon TE010 on the stages of embryogenic callus formation until plants in the transgenic events of Vx12-0277 variety showed significant expression of the *DDM1* gene in the initial stage of callus formation. In order to confirm whether the *DDM1* gene would influence the reduction of retrotransposon TE010 activity, methylation rate was evaluated by DNA sequencing with bisulfite. The results showed that transgenic plants presented higher level of methylation. Thus, this study demonstrated that energy cane capable to produce transgenic plants and *DDM1* gene reduced the expression level of the transposing element TE010, with potential to increase the estability of transgenes in the genome.

Keywords: *Saccharum spontaneum*, Somatic embryogenesis, Biolistics, *Agrobacterium tumefaciens*, Gene *DDM1*, Gene *AtBI-1*, DNA methylation, Transposition element

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Etapas da inoculação de cana-energia e introdução na cultura de tecidos. A: processo de assepsia de palmitos de cana energia em etanol 70%; B: o palmito é cortado em discos foliares em uma Placa de Petri contendo solução de ácido cítrico; C: os discos foliares são transferidos para o papel filtro para absorver o excesso da solução de ácido cítrico; D: os discos foliares são transferidos para o meio de cultura MS3K onde são mantidos no escuro.....22
- Figura 2. Fases do subcultivo na cultura de tecidos da cana-energia. Fase R0: disco foliar da cana no início da dediferenciação das células; Fases R1, R2 e R3: processo de formação de calos embriogênicos; Fase R4: calo embriogênico; P: Planta. Os calos foram subcultivados a cada vinte dias. Barra de escala das imagens corresponde a 5 mm23
- Figura 3. Plasmídeo pCAMBIA 0380. O gene de interesse *AtBI-1* tem o promotor *UBI-1*, e o gene *CP4-EPSPS* que confere resistência ao glifosato utiliza o promotor *Act1*.....25
- Figura 4. Representação da construção do plasmídeo pEP10, contém o promotor ubiquitina do milho (*Ubi-1*), o cDNA *AtDdm1* e o terminador da neopalina sintase (*T-nos*).26
- Figura 5. Esquema representativo do plasmídeo pHA9, contendo o promotor da ubiquitina do milho (*Ubi-1*), o cassete de expressão do gene *neo* (neomicina fosfotransferase) e o terminador da nopalina sintase (*T-nos*).26
- Figura 6. Sequência do elemento de transposição TE010 demonstrando as ilhas CpGs. Se observa três regiões CpGs em azul, a ilha 1 com um fragmento de 636 pb, a ilha 2 com 224 pb e a ilha 3 com fragmento de 633 pb. A Figura foi adaptada do site http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer2/MethPrimer_result.cgi.29
- Figura 7. Média de formação de calos embriogênicos. As variedades Vx12-0277, Vx12-1003, Vx12-1022, Vx12-1191, Vx12-1658 e Vx12-1744 foram analisadas no subcultivo R4. A análise estatística refere-se a média da quantidade total de calos embriogênicos obtidos por disco foliar introduzido no subcultivo R0. Análise estatística ANOVA e teste Tukey.31
- Figura 8. Média do nível de oxidação dos calos em cada subcultivo das variedades. Gráficos: (A) Vx12-1658; (B) Vx12-0277; (C) Vx12-1003; (D) Vx12-1022; (E) Vx12-1191; (F) Vx12-1744, sendo R0 coluna azul, R1 coluna laranja, R2 coluna vermelha e R3 coluna verde, nível de oxidação (NO). Análise estatística ANOVA e teste Tukey.....32
- Figura 9. Regeneração de plântulas *in vitro*. As figuras (A e B) representam o primeiro subcultivo para regenerar os calos embriogênicos que passaram pelo processo de transformação, o meio de cultura de regeneração de calos contém geneticina (30 mg. L-1). As figuras (C e D) representam o terceiro subcultivo onde apresentam o estágio de plântula.35
- Figura 10. Gel de agarose 1% com as amostras de DNA isolado de plantas da variedade Vx12-0277. Cada amostra representa uma planta diferente. O controle positivo foi o vetor pE010 (vt) e para o controle negativo foi utilizado a água (br). O tamanho do fragmento esperado é de 605 pb.....36
- Figura 11. Gel de agarose 1% com as amostras de DNA da variedade Vx12-1003. As amostras de plantas individualizadas 39 a 46 são referentes ao Evento 4; as amostras de 47 a 54 pertencem o Evento 7 e as amostras 55 a 61 pertencem ao Evento 8. O controle positivo foi vetor pEP10 (vt) e os controles negativos foram a água (br) e a planta não transgênica (wt). O tamanho do fragmento do gene *DDM1* é de 605 pb.....36
- Figura 12. Gel de agarose 1% para confirmação da inserção do gene *AtBI-1* nas amostras pertencentes a variedade Vx12-1744. Controle positivo; vetor pDM9 (vt). Controles negativos: água (br) e planta não transgênica (wt). Tamanho do fragmento esperado 820 pb.37
- Figura 13. Reação de PCR para confirmação da sequência do gene *VirG* de *Agrobacterium* EHA105 nas plantas Vx12-1744 que tiveram confirmação da inserção do gene *AtBI-1*. Controle positivo; EHA105 (ct). Controles negativos: água (br) e planta não transgênica (wt). O tamanho do fragmento esperado é de 450 pb.38
- Figura 14. Gel de agarose da reação de PCR com o gene *AtBI-1* em eventos da variedade Vx12-1003-*DDM1*. Controle positivo; vetor pDM9 (vt). Controles negativos: água (br) e planta não transgênica (wt). O tamanho do fragmento esperado é de 820 pb.....39

- Figura 15. Gel de agarose 1% com as reações de PCR dos eventos da variedade Vx12-1003-*DDMI*. A: Para o gene *DDMI*, foi usado como controle positivo o vetor pE010 (vt) e como controle negativo foram usados água (br) e a planta não transgênica (wt). O tamanho do fragmento esperado é de 605 pb. B: Para o gene *VirG*, DNA de *A. tumefaciens* EHA105 foi usado como controle positivo. O tamanho do fragmento esperado é de 450pb.40
- Figura 16. Análise de PCR com o gene *GAPDH* em gel de agarose 1%, com as amostras de cDNA de calos na fase R0 do subcultivo das variedades Vx12-1003 e Vx12-0277. Amostras 41 e 42 pertencem ao evento 8 da Vx12-1003; 45 e 49, pertencem ao evento 7 da Vx12-1003; Amostras 31 e 37 pertencem ao evento 3 da Vx12-0277; amostras 26, 27 e 30 pertencem ao evento 2 da Vx12-0277; amostras 1, 2 e 3 são plantas não transgênicas da variedade Vx12-0277. No controle negativo foram usados água (br). Tamanho do fragmento esperado foi de 180 pb.41
- Figura 17. Expressão do gene *DDMI* e do elemento de transposição TE010 em RT-qPCR, na fase de subcultivo R0. (A) Os eventos E7 e E8 pertencem a variedade Vx12-1003. (B) Os eventos E2 e E3 pertencem a variedade Vx12-0277. Planta não transgênica (WT). A coluna azul se refere ao gene *DDMI* e a coluna laranja ao retrotransposon TE010. Análise estatística ANOVA e teste Tukey.....42
- Figura 18. Expressão do gene *DDMI* e do elemento de transposição TE010 em RT-qPCR, na fase de subcultivo R1. (A) Os eventos E7 e E8 pertencem a variedade Vx12-1003. (B) Os eventos E2 e E3 pertencem a variedade Vx12-0277. Planta não transgênica (WT). A coluna azul se refere ao gene *DDMI* e a coluna laranja ao retrotransposon TE010. Análise estatística ANOVA e teste Tukey.....43
- Figura 19. Expressão do gene *DDMI* e do elemento de transposição TE010 em RT-qPCR, na fase de subcultivo R4. (A) Os eventos E7 e E8 pertencem a variedade Vx12-1003. (B) Os eventos E2 e E3 pertencem a variedade Vx12-0277. Planta não transgênica (WT). A coluna azul se refere ao gene *DDMI* e a coluna laranja ao retrotransposon TE010. Análise estatística ANOVA e teste Tukey.....44
- Figura 20. Expressão do gene *DDMI* e do elemento de transposição TE010 em plantas mantidas na casa de vegetação. (A) Os eventos E8 e E7 da variedade Vx12-1003 e os controles não transgênico (WT). (B) Os eventos E2 e E3 da variedade Vx12-0277 e os controles não transgênico (WT). A coluna azul representa os níveis de expressão do gene *DDMI* e a coluna laranja do elemento de transposição TE010. Análise estatística ANOVA e teste Tukey.....45
- Figura 21. Visão geral condensada do padrão de metilação observado. Do número 1 a 31 representam as regiões CpG na sequência de referência utilizada do elemento de transposição TE010. As sequências dos eventos das variedades Vx12-0277 e Vx12-1003 e das plantas controle não transgênicas (wt) são alinhadas com a sequência do TE010 e comparadas se houve ou não metilação nas regiões CpG, regiões em vermelho representam 100% de metilação, regiões em azul 0% de metilação e regiões em branco são desconhecidas.....46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos iniciadores do gene <i>DDMI</i>	25
Tabela 2. Sequência dos iniciadores do gene <i>neo</i>	26
Tabela 3. Sequência de iniciadores utilizados para análise de PCR do gene <i>AtBI-1</i>	27
Tabela 4. Sequência de iniciadores utilizados para análise de PCR da região <i>VirG</i>	27
Tabela 5. Sequência dos iniciadores utilizados para o gene <i>GAPDH</i>	28
Tabela 6. Sequência dos iniciadores utilizados no RT-qPCR.	29
Tabela 7. Sequência dos iniciadores utilizados na análise de metilação do TE010 por PCR.	30
Tabela 8. Regeneração de plantas por calos embriogênicos.	33
Tabela 9. Eficiência transformação genética por biolística dos calos embriogênicos das variedades Vx12-1003 e Vx12-0277 com os genes <i>DDMI</i> e <i>neo</i>	35
Tabela 10. Eficiência de transformação via <i>Agrobacterium</i> das variedades Vx12-0277 e Vx12-1744.	38
Tabela 11. Nível de metilação em porcentagem de cada sequência analisada da Vx12-0277 e Vx12-1003.....	47

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar tem grande importância econômica por ser uma das principais fontes de energia renovável. Os cultivares modernos são híbridos interespecíficos entre *Saccharum spontaneum* e *Saccharum officinarum* e possuem o genoma altamente poliplóide e complexo (Grivet, et al., 2001; Souza, et al., 2011), sendo que esses híbridos tem uma contribuição desigual no genoma parental entre *S. officinarum* que corresponde 80-90% e *S. spontaneum* que corresponde a 10-20% do genoma (Piperidis, et al., 2010; de Setta, et al., 2014). Com o aumento de demanda de energia, cultivares de cana-de-açúcar foram aprimoradas em programas de melhoramento genético para maior produção de biomassa, dando origem a cana-energia que tem alto teor de fibra, capacidade de produzir grande número de perfilhos, sistema radicular vigoroso e presença de rizomas conferindo à cana-energia resistência ao déficit hídrico ou baixas temperaturas (Carvalho-Netto et al. 2014). Com essas características herdadas da espécie *Saccharum spontaneum*, a cana-energia passou a ter grande importância como fonte renovável de energia, sendo utilizada na produção de etanol de Segunda Geração e na geração de bioeletricidade a partir da queima do bagaço (Matsuoka, et al., 2014).

Com a demanda crescente de energia renovável há a necessidade de aprimorar a produção de biomassa. Mais recentemente, ferramentas de biologia molecular e transformação genética passaram a ser consideradas, pois podem contribuir para acelerar o processo para produzir novas cultivares de cana-energia contendo características de interesse para a cultura como o gene *AtBI-1* (*Bax Inhibitor-1*) que isolado de *Capsicum annuum* conferiu tolerância a alta temperatura, estresse hídrico e alta salinidade em plantas de tabaco (Isbat et al., 2009) e o seu ortólogo isolado de *Arabidopsis thaliana*, demonstrou tolerância à estresse hídrico em cana-de-açúcar (Watanabe and Lam, 2006; Ramiro et al., 2016).

Protocolos de transformação genética de cana-de-açúcar a partir de calos embriogênicos já foram estabelecidos (Lakshmanan, et al. 2006; Ithape, 2017) para cultivares convencionais as quais prevalecem a espécie *S. officinarum*, mas carece de dados para as variedades de cana-energia com maior prevalência de cromossomos de *S. spontaneum* (Souza, et al., 2019). A formação de calos embriogênicos ocorre em resposta a estímulos hormonais na cultura de tecidos, que pode ocasionar em alterações genéticas e epigenéticas, influenciar na movimentação de elementos de transposição e mudanças na metilação do DNA (Masuta, et al., 2017). Estudos demonstram que o gene *DDM1* (*Decreased in DNA Methylation 1*) está relacionado com a metilação do DNA, a sua disfunção resulta na hipometilação do DNA facilitando a mobilização de elementos de transposição (Zhang, et al., 20018). Devido à mobilidade dos elementos de transposição a sua atividade ocasiona alterações estruturais em genes únicos ou no genoma, alterando a expressão gênica e até mesmo a função gênica (Rossi, et al., 2001). Estudos recentes dos elementos de transposição mais abundantes na cana-de-açúcar estão os retrotransposons LTR correspondendo à 40,86%, os transposons de DNA e os retrotransposons não LTR sendo 7,93% (de Setta, et al., 2014), dentre esses elementos de transposição foi selecionado o retrotransposon TE010 que pertence a família *Hopscotch* (Rossi, et al., 2001; de Araujo, et al., 2005) para estudo nesse trabalho.

Desde que a transformação genética de cana-energia é dependente do processo de embriogênese somática que pode levar a alta taxa de variação somaclonal resultante da ativação de elementos de transposição, a hipótese deste trabalho foi determinar se o gene *DDM1* é capaz de silenciar a atividade de elementos de transposição, demonstrado pelo retrotransposon TE010 na cultura de tecidos.

O presente trabalho teve como objetivos: Avaliar quais das variedades Vx12-1003, Vx12-1744, Vx12-1191, Vx12-0277, Vx12-1658 e Vx12-1022 de cana-energia apresentam maior média de formação de calos

embriogênicos, obtenção de transformantes genéticos via *Agrobacterium tumefaciens* e biolística com o gene *DDM1* e *AtBI-1* como também, analisar a expressão do gene *DDM1* na estabilidade do elemento de transposição TE010.

2. REVISÃO DE BIBLIOGRÁFICA

2.1. Cana-energia

Os recursos energéticos na maioria dos países desenvolvidos provêm de fontes não renováveis como o carvão, gás natural e o petróleo, o que causa insegurança energética e gera os desafios de encontrar novas fontes energéticas visando à sustentabilidade do meio ambiente e sem que haja competição com a produção de alimentos. Algumas plantas têm o potencial de atender às necessidades energéticas para produção de bioetanol de segunda geração, as quais devem apresentar alta produção de biomassa em pouco tempo e deve ser preferencialmente originada de plantas fibrosas (Sticklen, 2008; Carvalho-Netto et al. 2014). Uma das opções de plantas com essas características são as gramíneas como a cana-de-açúcar (*Saccharum spp*), uma planta com sistema fotossintético C4, que em ambientes mais quentes permite maior eficiência da fixação de CO₂ (El Bassam, 1998; Woodard, 1993).

Dentro desses aspectos, o Brasil encontra-se em vantagem, por ser um país tropical tendo grande extensão de terras agricultáveis, disponibilidade de água e energia solar. Com a criação do programa PROALCOOL em 1975, a cana-de-açúcar ganhou maior destaque como matéria prima na produção de etanol na geração de energia térmica e elétrica, além da produção de outros subprodutos (Goldemberg, et al. 2008; Goldemberg J, 2008). Segundo o 4º levantamento da Safra de cana-de-açúcar 2019/2020 divulgado pela Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), o Brasil deverá produzir 30,3 bilhões de litros de etanol (Conab, 2020).

Os recentes programas de melhoramento de cana-de-açúcar passaram a incluir a obtenção de plantas com maior rendimento de fibras para produção de bioenergia. Essas plantas denominadas cana-energia são mais rústicas, resistentes em climas áridos e a pragas, além de serem menos exigentes em nutrientes (Hill, et al. 2006; Johnson, et al. 2007; Gonzales-Hernandez, et al. 2009). A cana-energia é uma cultivar criada a partir da hibridização entre as espécies *Saccharum spontaneum* e *Saccharum officinarum*, contendo alto teor de fibras e baixo rendimento de sacarose características herdadas da espécie *Saccharum spontaneum* (Tew and Cobill; 2008; Carvalho-Netto et al. 2014). A cana-de-açúcar e a cana energia se diferenciam na composição. Em média a cana-energia possui 26,7% de fibra que consiste em: 43,3% de celulose, 23,8% de hemicelulose, 21,7% de lignina e um teor de sacarose de 9,6%. Já a cana-de-açúcar, tem em média 41,6% de celulose, 25,1% de hemicelulose, 20,3% de lignina e um teor de sacarose de 13% (Kim, et al. 2011). A cana energia é classificada em duas categorias: O Tipo I tem características mais próximas da cana convencional, no entanto com menor teor de sacarose e inversamente maior teor de fibras; já o Tipo II o teor de fibra é superior ao Tipo I, sendo de uso exclusivo para produção de biomassa (Tew and Cobill, 2008).

Devido à crescente demanda por energia renovável, a cana-energia passa a ser uma alternativa importante para o setor sucroenergético, com a alta produção de biomassa, alto teor de hemicelulose e celulose em suas fibras, podendo assim ser explorada na geração de etanol de segunda geração e de energia elétrica (Yang, et al. 2006; Loureiro, et al. 2011).

Diante desses aspectos, a necessidade de gerar novas cultivares de cana-energia que produzam maior teor de biomassa, ferramentas de biologia molecular como a transformação genética pode contribuir com a expressão de genes de interesse com características desejáveis, as quais seriam muito difíceis de obter pelo melhoramento clássico adicionado ao longo do período para selecionar cultivares com as características de relevância agrônômica (Butterfield, et al., 2002).

2.2. Cultura de tecidos

A cultura de tecidos é uma tecnologia fundamental na engenharia genética. Os avanços nas técnicas de cultivo *in vitro* favoreceram a otimização dos protocolos de regeneração de plantas (Ithape, 2017). Na grande maioria das espécies vegetais, a embriogênese somática é uma etapa essencial na transformação genética tanto por biolística quanto via *Agrobacterium* (Arruda, 2012).

O processo de embriogênese somática pode acontecer de duas maneiras; de forma indireta, onde se tem a formação de calos (Basnayake, et al. 2011) e de forma direta, onde não ocorre o estágio intermediário de formação de calos (Watt, et al. 2009). Outra forma de regeneração de plantas *in vitro* é pela organogênese, onde o material vegetal regenera novas plantas a partir de segmentos foliares imaturos ou de meristemas (Lakshmanan, et al. 2006).

Apesar da etapa de cultura de tecidos de cana-de-açúcar ser essencial para a obtenção de plantas transgênicas, a tecnologia apresenta um aspecto negativo que é a variação somaclonal que ocorre devido ao longo período de contato do material vegetal com os reguladores de crescimento necessários para a indução de calos embriogênicos e regeneração das plantas (Lakshmanan, et al. 2006). Variações somaclonais são variabilidades genéticas e fenotípicas que acontecem em plantas produzidas *in vitro* (Wang and Wang, 2012). As variações somaclonais podem ser de origem genética ou epigenética (Jain, 2001; Kaeppler, et al. 2000). As mudanças genéticas que podem ocorrer são alterações no nível de ploidia, que ocasionam mutações fisiológicas, fenotípicas e no metabolismo das plantas. Além de alterações na ploidia, também podem ocorrer mutações gênicas, recombinações cromossômicas e movimentação de elementos de transposição e retrotransposons (Yang & Loh, 2004). Já a variação epigenética, influencia na replicação, na transposição de genes, no reparo do DNA, além de influenciar a regulação transcricional da expressão gênica através de modificações na cromatina (Sahu, et al. 2013). Essas modificações na cromatina envolvem a modificação de histonas, a metilação do DNA e a remodelagem da cromatina (Bird, 2002).

Estudos apontam que calos embriogênicos e plantas regeneradas a partir deles têm um elevado número de elementos de transposição (ETs) (Planckaert and Walbot, 1989; de Araujo et al. 2005; Masuta, et al. 2017). Segundo Gao, et al. (2014), quanto maior o período da indução e diferenciação de calos em meios de cultura com o hormônio 2,4-D (ácido-2,4-diclorofenoxiacético), maior a variação na metilação do DNA.

2.3. Gene *DDM1*

O gene *DDM1* (*Decreased in DNA Methylation 1*) é um remodelador de cromatina, que pertence a família SW12/ SNF2 (Vongs, et al. 1993; Jeddloh, et al. 1998). Estudos em *Arabidopsis thaliana* relatam que o *DDM1* afeta a metilação do DNA na heterocromatina dos elementos transponíveis, tendo como alvo principal transposons de DNA *Mutator* e retrotransposons de terminais longos. O *DDM1* também pode regular a expressão de genes codificadores de proteínas regulando os elementos de transposição (ETs) (Lippman, et al. 2004; Zhang, et al. 2016). O ATP é hidrolisado pelos remodeladores SNF2 a fim de se locomoverem ao longo do DNA, modificando a localização e composição dos nucleossomos possibilitando outras proteínas de acessarem o DNA (Ryan and Owen-Hughes, 2011). A ausência de expressão do gene *DDM1* leva a ativação transcricional dos elementos de transposição (Lippman, et al., 2004).

Segundo Zemach, et al. (2013), o gene *DDM1* é necessário para a metilação do DNA em sequencias longas dos elementos de transposição. Existem três classes de metilação: as que ocorrem nas regiões CG mantidas pela *Methyltransferase* (MET1) durante a replicação do DNA, nas regiões CHH mediadas pela *Chomomethylase 2* (CMT2)

e as metilações que ocorrem na região CHG mediada pela *Chromomethylase 3* (CMT3) (Long, et al. 2018). Os elementos de transposição são fragmentos de DNA que se movimentam dentro do genoma (Feschotte *et al.*, 2002). Os ETs atuam como agentes mutagênicos produzindo mudanças na sequência de gene únicos podendo remodelar os padrões da função gênica e da expressão (Bennetzen, 2000).

Existem duas classes de elementos de transposição nos genomas vegetais: A Classe I, os elementos são os retrotransposons, que é a classe mais comum em plantas, onde os retroelementos movimentam-se pelo mecanismo conhecido como “cópia e cola”, o RNAm transcrito do ET pela RNA polimerase II é convertido em cDNA por transcrição reversa e é integrado em uma nova posição no genoma por uma enzima integrase. Os elementos da classe I são identificados como retrotransposons com LTRs (*long terminal repeats*) autônomos e codificam todas as proteínas necessárias para a transposição. Já os LTRs não-autônomo são conhecidos como TRIM (*terminal-repeat retrotransposons in miniature*), eles necessitam de enzimas codificadas por elementos autônomos intactos, que são divididos em SINEs (*short interspersed nuclear elements*) e LINEs (*long interspersed nuclear elements*) (Feschotte, *et al.*, 2002; Lisch, 2013)

Os elementos da classe II são conhecidos como TIRs (*terminal inverted repeats*), eles se locomovem através do mecanismo “cópia e cola”, utiliza a enzima transposase que é codificada pelo ET, onde o elemento é excisado e reintegrado em uma nova região no genoma. Em plantas os elementos mais comuns dessa classe pertencem as superfamílias *Mutator-like Element* (MULE), hAT (*hobo*, *Activator* e *Tam3*) e a família *CACTA*. Já os elementos não-autônomos são chamados de MITEs (*miniature inverted-repeat transposable elements*) (Feschotte *et al.*, 2002 ; Lisch, 2013).

Através do Projeto Brasileiro de Sequenciamento de Cana-de-açúcar (SUCEST), foram identificados 68 elementos de transposição que foram caracterizados em 11 famílias. As famílias *Mutator* e *Hopscotch* foram as mais representadas no transcriptoma da cana-de-açúcar, sendo responsáveis por mais de 50% da expressão dos ETs. Dentre os elementos de transposição os quais foi analisada a expressão está o TE010 que pertence à família *Hopscotch*. Análises de expressão demonstraram que esse retrotransposon apresenta maior expressão na fase de calo (de Araujo, et al. 2005).

Com a possibilidade do gene *DDM1* silenciar elementos de transposição em plantas, foi considerada a hipótese que o gene *DDM1* isolado de *Arabidopsis thaliana* poderia conferir a estabilidade de transgenes no genoma de cana-energia, diante disso um segundo gene foi estudado, o *AtBI-1*, que além de contribuir com os estudos da estabilidade de um transgene nas plantas expressando *DDM1*, poderia introduzir tolerância ao estresse hídrico em cana energia.

2.4. Gene *AtBI-1*

O gene *AtBI-1* (*Bax Inhibitor-1*) tem a capacidade de bloquear a morte celular mediada pela proteína BAX (Xu and Reed, 1998). A proteína BAX está localizada na membrana mitocondrial, quando ocorre sua ativação o citocromo c é liberado, estimulando as caspases e clivando proteínas que induzem a morte celular (Danial and Korsmeyer, 2004). A morte celular programada é um mecanismo que as plantas possuem para autodestruição das células quando estas são danificadas por algum fator de estresse (Lam, 2004).

A proteína BI-1 está localizada no retículo endoplasmático e tem domínios *trans*-membranares em *Arabidopsis* (Chae, et al. 2004). Estudos indicam que íons de cálcio funcionam como sinalizadores da morte celular programada. Esses íons ficam armazenados no retículo endoplasmático e determinam a sensibilidade das células ao estresse apoptótico. Sugere-se que os íons de cálcio sejam translocados para a mitocôndria e induzam a morte celular

através de sinais apoptóticos (Scorrano, et al. 2003). Uma proteína anti-apoptótica BCL-2, identificada em animais, quando superexpressa no retículo endoplasmático reduz o nível de íons de cálcio (Foyouzi-Youssefi, et al. 2000).

A expressão de *BAX* em células vegetais gera espécies reativas de oxigênio (ROS), o rompimento de organelas e o escape de íons de cálcio das células (Beaek, et al. 2004). Já quando o *ABI-1* é superexpresso junto com o *BAX* em *Arabidopsis*, o escape de íons é evitado, mas não a geração de ROS (Kawai-Yamada, et al. 2004). Entende-se que o *ABI-1* é um gene anti-apoptótico evitando a sinalização da morte programada (Ihara-Ohori, et al. 2007).

Em espécies como tabaco e *Arabidopsis*, a superexpressão do *AtBI-1* concedeu maior tolerância a estresses abióticos, como o calor e a seca (Watanabe and Lam, 2006). Quando o gene *AtBI-1* foi superexpresso em cana-de-açúcar conferiu maior tolerância ao estresse hídrico (Ramiro, et al. 2016).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar se o gene *DDM1* envolvido na atividade de elementos de transposição contribuiria para aumentar a estabilidade genética de transgenes expressos em cana energia.

3.2. Objetivos específicos

Para atingir o objetivo geral, o trabalho foi apresentado considerando os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar quais das variedades de cana-energia estudadas Vx12-1003, Vx12-1744, Vx12-1191, Vx12-0277, Vx12-1658 e Vx12-1022 apresentam maior média de formação de calos embriogênicos, baixo nível de oxidação e maior taxa de regeneração de plantas;
- Obtenção de transformantes genéticos por biolística com o gene *DDM1* e por via *Agrobacterium tumefaciens* com o gene *AtBI-1*;
- Retransformação de em plantas transgênicas-*DDM1* com o gene *AtBI-1*;
- Analisar a expressão do gene *DDM1* na estabilidade do elemento de transposição TE010.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos dessa dissertação foram conduzidos no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas e Genômica, localizado no CEBTEC (Centro de Biotecnologia Agrícola-Laboratório Otto Jesu Crocomo), pertencente ao Departamento de Ciências Biológicas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

4.1. Material vegetal

Plantas de cana-energia utilizadas neste trabalho foram fornecidas pela empresa GranBio, sendo as variedades: Vx12-1003, Vx12-1744, Vx12-1191, Vx12-0277, Vx12-1658 e Vx12-1022.

4.2. Cultura de tecidos de cana-energia

Para as atividades de cultura de tecidos, ápices foliares das seis variedades de cana-energia foram coletados com dez meses de idade, e as folhas externas retiradas até a obtenção do palmito (conjunto de folhas imaturas), em seguida foi realizada a lavagem por fricção com etanol 70% para desinfecção do material vegetal, onde esse processo se repete por três vezes. Após a assepsia os palmitos foram transferidos para o fluxo laminar.

Em câmara de fluxo laminar, retirou-se duas a três folhas externas dos palmitos que foram transferidos para placas de Petri contendo solução de ácido cítrico 150 mg.L^{-1} , onde foram cortados discos foliares de 1 a 2 mm e transferidos para placas de Petri contendo meio MS3K, composto por sais do meio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 3 mg.L^{-1} de 2,4-D (ácido-2,4-diclorofenoxiacético), $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de cinetina e 150 mg.L^{-1} de ácido cítrico (Figura 1).

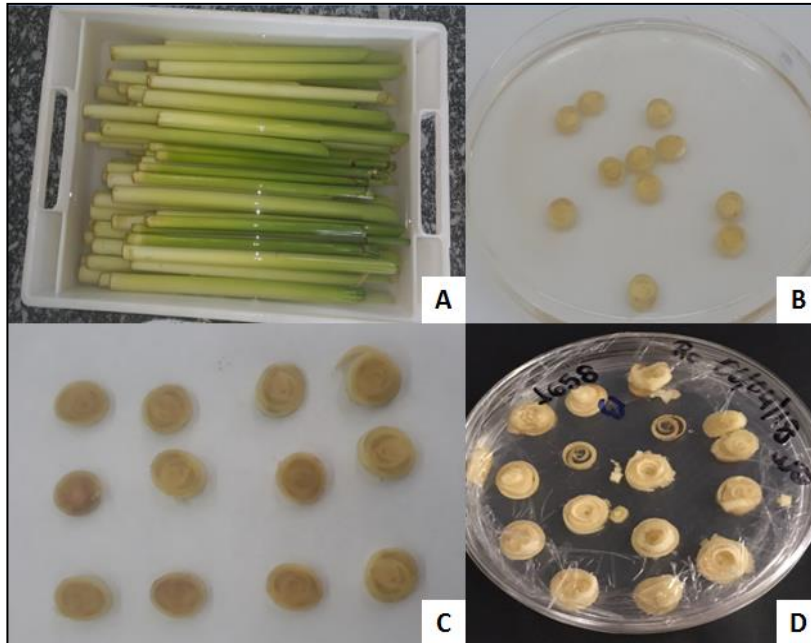


Figura 1. Etapas da inoculação de cana-energia e introdução na cultura de tecidos. A: processo de assepsia de palmitos de cana energia em etanol 70%; B: o palmito é cortado em discos foliares em uma Placa de Petri contendo solução de ácido cítrico; C: os discos foliares são transferidos para o papel filtro para absorver o excesso da solução de ácido cítrico; D: os discos foliares são transferidos para o meio de cultura MS3K onde são mantidos no escuro.

Após a inoculação dos discos foliares, designado como R₀, estes permaneceram entre 18 a 25 dias no escuro para dar origem aos calos embriogênicos. Em cada subcultivo, designadas de R₁, R₂, R₃ e R₄, foram selecionadas as regiões não oxidadas e as estruturas com formação de calos embriogênicos (Figura 2). Na fase R₁ é observado o início da formação de células indiferenciadas que dará início a formação dos calos, na fase R₂ já se observa-se a formação de calos embriogênicos, na fase R₃ os calos continuam o crescimento e multiplicação e na fase R₄ os calos embriogênicos são selecionados para regenerar plantas em meio de regeneração MRP constituído os sais MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 0,45 mg.L⁻¹ BAP (6-benzilaminopurina), 0,1 mg.L⁻¹ ANA (ácido naftaleno acético), sendo mantidos sob fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro a 26 °C ± 2 °C.

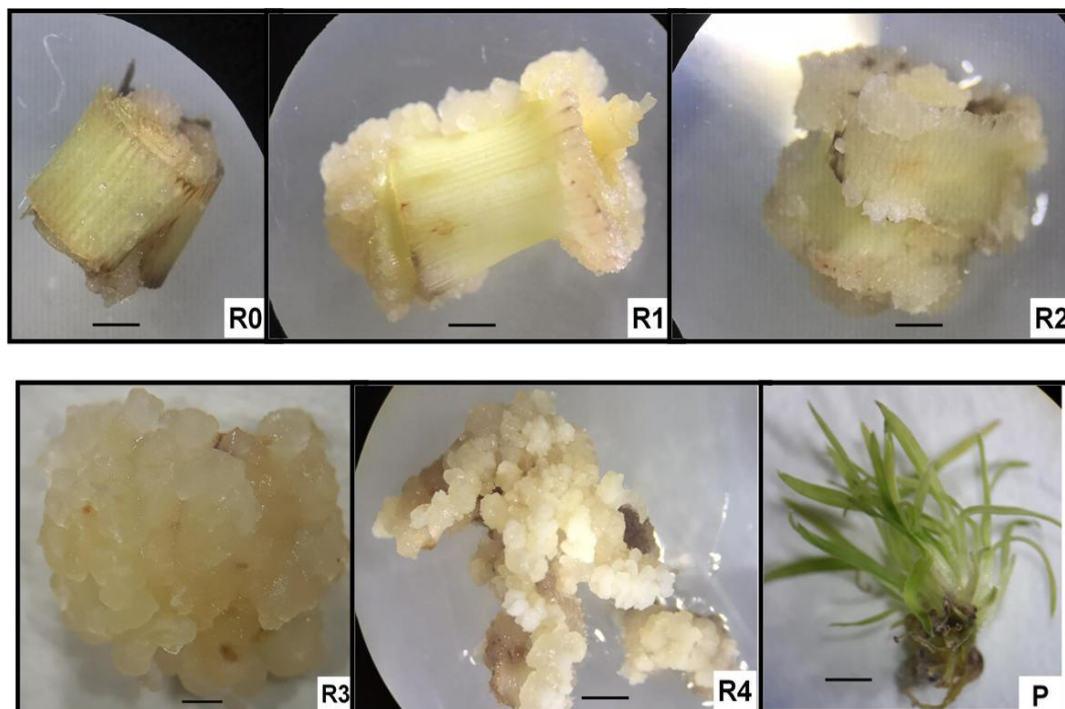


Figura 2. Fases do subcultivo na cultura de tecidos da cana-energia. Fase R₀: disco foliar da cana no início da dediferenciação das células; Fases R₁, R₂ e R₃: processo de formação de calos embriogênicos; Fase R₄: calo embriogênico; P: Planta. Os calos foram subcultivados a cada vinte dias. Barra de escala das imagens corresponde a 5 mm

4.3. Transformação genética

4.3.1. Método de biolística

Para transformação genética pelo método de biolística foram utilizados calos embriogênicos das variedades Vx12-1003 e Vx12-0277, devido essas variedades terem apresentado resultados de alta eficiência na geração de calos embriogênicos (ambas variedades apresentaram a média de 3,5 calos por disco foliar) e na regeneração de plantas (63% e 66% eficiência de regeneração), além de apresentarem bom desempenho no campo (informação Granbio). Nessa etapa utilizou-se um acelerador de micropartículas modelo PDS-1000/He *Biolistic® Delivery System* (BIO-RAD), para o processo de transformação. Foi utilizado micropartículas de ouro de 1 μm , onde o DNA se liga por atração eletrostática e é transportado para o tecido vegetal. Antes da etapa de transformação os calos embriogênicos passaram por um tratamento, onde permaneceram por quatro horas antes e após o bombardeamento em meio de indução MS3K osmótico, que consiste do meio MS3K suplementado com 73 g.L^{-1} de sorbitol e 73 g.L^{-1} de manitol (Vain et al. 1993), gelificado com 2,4 g.L^{-1} de *Phytigel* (Sigma). O bombardeamento foi realizado por co-transformação utilizando o plasmídeo pEP10 que contém o gene *DDM1* sob controle do promotor *UBi-1* e o plasmídeo pHA9 contendo o gene *neo* que codifica para neomicina fosfotransferase responsável por conferir resistência ao antibiótico geneticina (Picelli, 2010). Em seguida, os calos foram transferidos para o meio MS3K, onde permaneceram por 5 dias no escuro para recuperação. Após este período, foram transferidos para meio MS3K suplementado com 30 mg.L^{-1} de geneticina, onde permaneceram por mais 30 dias no escuro. Transcorridos os trinta dias no escuro os calos embriogênicos de cana-energia, foram então, transferidos para meio de regeneração MRP composto por sais MS suplementado com 0,45 mg.L^{-1} BAP (6-benzilaminopurina), 0,1

mg.L⁻¹ ANA (ácido naftaleno acético) e adicionado 30 mg.L⁻¹ do agente seletivo geneticina, sendo o fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro a 26 °C ± 2 °C.

4.3.2. Via *Agrobacterium tumefaciens*

Para a transformação genética via *Agrobacterium*, foi utilizado o plasmídeo pCAMBIA 0380 contendo em sua construção o gene *AtBI-1*, sob o controle do promotor ubiquitina do milho (*Ubi-1*) e o gene que confere resistência ao glifosato *CP4-EPSPS*, sob o controle do promotor actina do milho (*Act1*). Esta construção foi feita por Eduardo Camargo (Figura 3) e cedida para os experimentos. O plasmídeo foi inserido por eletroporação na *Agrobacterium tumefaciens* EHA105. Para transformação via *Agrobacterium* foram utilizados calos embriogênicos das variedades Vx12-0277 e Vx12-1744 de cana-energia, a escolha dessas variedades para serem transformadas foi devido ao eficiente resultado na geração de calos embriogênicos, sendo 3,5 calos e 3,8 calos por disco foliar, como também na regeneração de plantas, tendo a eficiência de 83% a Vx12-1444 e a Vx12-0277 com 66%, além de já serem plantas comerciais. A metodologia utilizada foi baseada no protocolo desenvolvido por Alves et al. (2009) com algumas modificações descritas a seguir.

Agrobacterium transformada com o vetor foi inoculada em uma placa de meio LB contendo 100 mg.L⁻¹ de Rifampicina e 100mg.L⁻¹ de Kanamicina. Após 3 dias no escuro à 28 °C houve o crescimento das colônias e com o auxílio da alça de Drigalski raspou-se todo o aglomerado de colônias que foram transferidas para um tubo Falcon de 50mL e adicionado 5 mL do meio de indução que é composto por sais do meio MS (Murashige& Skoog, 1962) e 30 g.L⁻¹ de sacarose. A solução foi homogeneizada por inversão, sendo adicionado aos poucos mais meio de indução. A quantidade de meio de indução foi definida a partir do cálculo de diluição $C.V = C^f.V^f$, à medida que a OD (densidade óptica) da solução foi monitorada. A OD foi medida em espectrofotômetro e mantida entre 0,6 nm a 0,75 nm.

Em seguida, adicionou-se 15 mg.L⁻¹ de acetoceringona à solução de *Agrobacterium* juntamente com os calos embriogênicos previamente selecionados. A solução contendo os calos foi mantida sob agitação por 30 minutos a 28 °C a 30 rpm no escuro. Após este período, o excesso do meio de indução foi descartado e os calos foram transferidos para uma placa de Petri de vidro contendo papel filtro por aproximadamente 10 minutos para secar o excesso da solução de *Agrobacterium*. Em seguida, os calos foram transferidos para o meio MS3K contendo 15 mg.L⁻¹ de acetoceringona e mantidos no escuro por três dias. Após esse período, os calos foram transferidos para o meio de regeneração MRP com 300 mg.L⁻¹ de Timentin® sob fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro a 26 °C ± 2 °C, onde foram mantidos por 60 dias, após esse período as plântulas são transferidas para o meio MS contendo 300 mg.L⁻¹ de Timentin®. Apesar de a construção ter o gene de tolerância ao herbicida glifosato, não foi usado agente seletivo no meio de cultura.

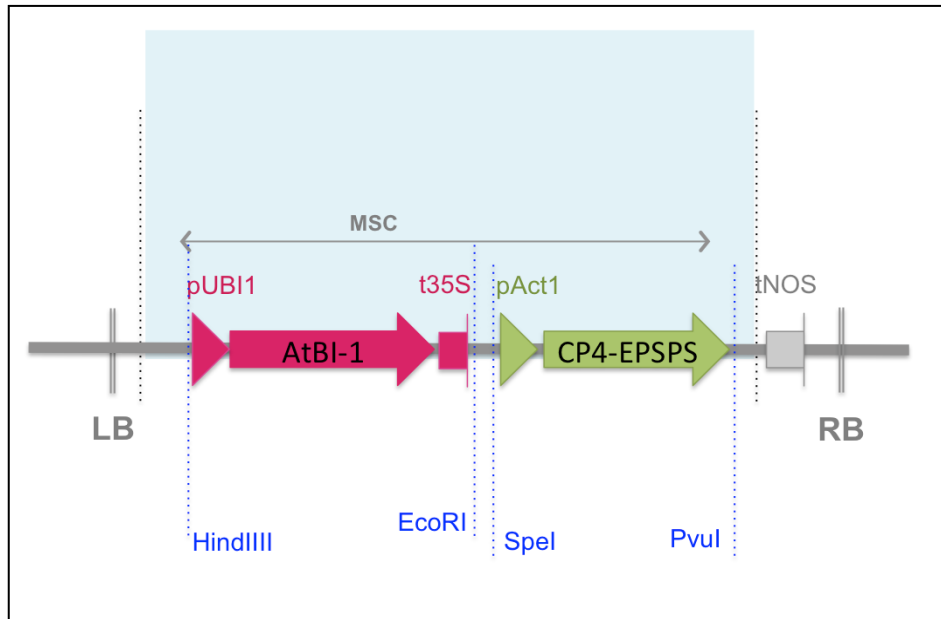


Figura 3. Plasmídeo pCAMBIA 0380. O gene de interesse *AtBI-1* tem o promotor *UBI-1*, e o gene *CP4-EPSPS* que confere resistência ao glifosato utiliza o promotor *Act1*.

4.4. Identificação das plantas transgênicas por PCR

4.4.1. Confirmação de plantas transformadas com o gene *DDM1*

O DNA genômico foi extraído das folhas de cana-energia regeneradas em meio seletivo, sendo coletadas e armazenadas em freezer -80 °C, até a realização do isolamento do DNA. O método de extração utilizado foi baseado no método CTAB (Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide) desenvolvido por Doyle & Doyle (1978).

Para reação de PCR (reação em cadeia da polimerase) utilizou-se 50 ng.µl⁻¹ de DNA para confirmação da inserção dos cassetes contendo o gene *neo* (de seleção) e o gene de interesse *DDM1*. A integridade e concentração do DNA isolado foi verificada no espectrofotômetro NanoDrop® (ThermoScientific) e em gel de agarose (1%).

A reação de PCR foi realizada utilizando os iniciadores apresentados na Tabela 1 e seguindo o procedimento a seguir: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min; 40 ciclos de 45 segundos a 94 °C para desnaturação, 50 segundos a 58,5 °C para pareamento dos iniciadores e 50 segundos a 72 °C para extensão; extensão final a 72 °C por 10 minutos (Picelli, 2010).

Tabela 1. Sequência dos iniciadores do gene *DDM1*.

Iniciadores	Sequência	Fragmento amplificado
<i>Forward</i>	5` - CCT GCC TTC ATA CGC TAT TTA TTT GCT TG - 3`	605 pb
<i>Reverse</i>	5` - GAT CTT GAA ATC ATA GCA GCA ACC GC - 3`	

O tamanho do fragmento amplificado do gene *DDM1* esperado foi de 605 pb, pelo pareamento do iniciador *Forward* (senso) na região terminal do promotor *Ubi-1* (íntron) e do iniciador *Reverse* (antissenso) na sequência do gene *DDM1* (Figura 4).

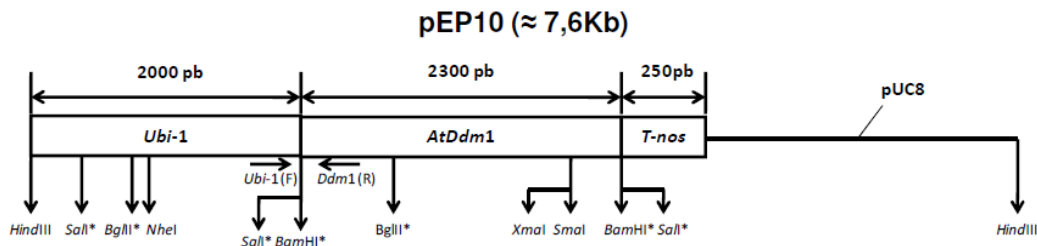


Figura 4. Representação da construção do plasmídeo pEP10, contém o promotor ubiquitina do milho (*Ubi-1*), o cDNA *AtDdm1* e o terminador da neopalina sintase (*T-nos*).

Os iniciadores utilizados estão descritos na tabela 2 e a reação de PCR para detecção do gene *neo* que confere resistência a geneticina seguiu o seguinte protocolo: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, 35 ciclos: 1 minuto a 94 °C para desnaturação, 45 segundos a 60 °C para pareamento dos iniciadores e 40 segundos a 72 °C para extensão e extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Tabela 2. Sequência dos iniciadores do gene *neo*.

Iniciadores	Sequência	Fragmento amplificado
<i>Forward</i>	5` CTC TGC TCG ACG TTG TCA CT 3`	437 pb
<i>Reverse</i>	5` AGC CAA CGC TAT GTC CTG AT 3`	

Os iniciadores amplificam um fragmento de 437 pb, pelo pareamento na região terminal do promotor *Ubi-1* (íntron) e na sequência de gene *neo*. A disposição dos iniciadores no plasmídeo pHA9 garante que o gene *neo* amplificado tenha sido originado do transgene inserido no genoma da cana energia (Figura 5).

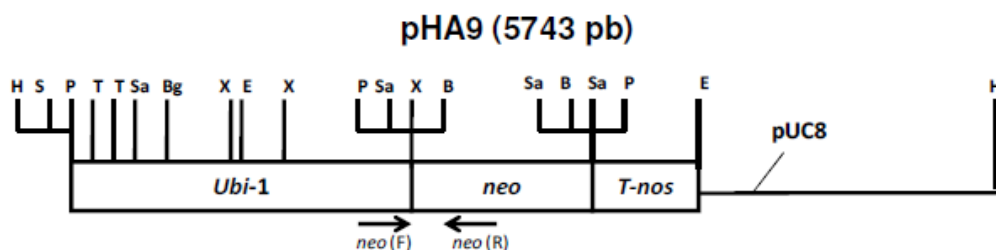


Figura 5. Esquema representativo do plasmídeo pHA9, contendo o promotor da ubiquitina do milho (*Ubi-1*), o cassete de expressão do gene *neo* (neomicina fosfotransferase) e o terminador da nopalina sintase (*T-nos*).

Em todas as reações de PCR utilizou-se como controle negativo a água e também o DNA de plantas de cana-energia não transformadas (wt). Utilizou-se como controle positivo, o plasmídeo pEP010 para o gene *DDM1* e

o plasmídeo pHA9 para o gene *neo*, para a validação dos resultados. As reações de PCR foram analisadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e as imagens foram reveladas no fotodocumentador *Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+* whit *ImageLab™ Software* (BIORAD).

4.4.2. Confirmação de plantas transformadas com o gene *AtBI-1*

Para confirmação de plantas transformadas via *Agrobacterium* foi extraído o DNA genômico das folhas utilizando à metodologia já descrita a cima desenvolvida por Doyle & Doyle (1987). O protocolo utilizado para as reações de PCR foi: desnaturação inicial por 5 minutos a 95 °C; 35 ciclos: 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 60 °C, 1 minuto a 72 °C; extensão final por 5 minutos a 72 °C. Os pares de iniciadores utilizados para confirmação dos transgenes com o gene *AtBI-1* foram descritos por Melotto-Passarin 2009, (Tabela 3).

Tabela 3. Sequência de iniciadores utilizados para análise de PCR do gene *AtBI-1*.

Iniciadores	Sequência	Fragmento amplificado
<i>Forward</i>	5' GCC CTG CCT TCA TAC GCT ATT 3'	820 pb
<i>Reverse</i>	5' CAT AGT CCA TGT CAC CGA GGT 3'	

4.4.3. Análise de PCR para o gene *virG*

Para confirmar se as plantas que apresentavam a presença do gene *AtBI-1*, tiveram a integração do gene no genoma ou se o resultado seria pela presença de *Agrobacterium*, foi realizada uma reação de PCR com os iniciadores complementares com a região *vir* de *Agrobacterium*. A reação de PCR realizada seguiu o seguinte protocolo: desnaturação inicial por 2 minutos a 96 °C; 35 ciclos: 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 52 °C e 30 segundos a 72 °C; extensão final por 5 minutos a 72 °C. Os pares de iniciadores utilizados para amplificação da região *VirG* foram descritos por Negrotto, et al. (2000) (Tabela 4).

Tabela 4. Sequência de iniciadores utilizados para análise de PCR da região *VirG*.

Iniciadores	Sequência	Fragmento amplificado
<i>Forward</i>	5' - CTG GCG GCA AAG TCT GAT - 3'	450 bp
<i>Reverse</i>	5' - TGT CGT AAA CCT CCT CGT - 3'	

4.5. Retransformação de plantas transgênicas para o gene *DDM1*

Para avaliar se o gene *DDM1* poderia influenciar na estabilização de transgenes, plantas da casa de vegetação das variedades Vx12-1003 e Vx12-0277 com aproximadamente 10 meses já confirmadas serem transgênicas para o gene *DDM1*, foram reintroduzidas na cultura de tecidos para geração de calos embriogênicos, os quais foram retransformados via *Agrobacterium* com o gene *AtBI-1*. Após a regeneração de plantas *in vitro* foi realizada a análise de PCR para confirmação da inserção do gene *AtBI-1* no genoma da cana-energia-*DDM1*.

4.6. Análise de expressão dos genes *DDM1* e do retrotransposon TE010

Foram coletadas amostras das plantas de cana-energia confirmadas serem transgênicas para o gene *DDM1*. As amostras foram coletadas nas fases R₀, R₁ e R₄, já que nas fases R₀ e R₁ é onde ocorre a diferenciação das células possivelmente com maior atividade dos elementos de transposição e na fase R₄ quando o calo embriogênico já está desenvolvido. Amostras de folhas de plantas crescendo em casa de vegetação com aproximadamente 10 meses também foram coletadas. As amostras foram armazenadas no freezer -80 °C até serem utilizadas para extração do RNA. O RNA total foi extraído pelo método do Trizol (Invitrogen), de acordo com a metodologia recomendada pelo fabricante. O RNA isolado foi analisado em gel de agarose 2% para avaliar a integridade do RNA obtido após a extração. A quantificação foi realizada no espectrofotômetro Nanodrop (ThermoScientific). Para eliminar possíveis contaminações com DNA genômico, o RNA total extraído foi tratado com *Amplification grade DNase I livre de RNase* (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Para a síntese do cDNA, foi utilizado 1 µg do RNA total tratado com DNase I, seguindo a metodologia do kit SuperScript[®]III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen).

4.7. Normalização e análise de expressão do gene *GAPDH*

O cDNA foi normalizado antes de ser utilizado na reação de RT-qPCR, sendo o gene *GAPDH* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) utilizado como controle, pois em estudos anteriores apresentou maior uniformidade na expressão do mRNA em diferentes tecidos de cana-de-açúcar (Iskandar et al. 2004).

Nas reações de PCR para normalização do gene *GAPDH* foram utilizados os iniciadores da Tabela 5 seguindo o protocolo: desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos; 35 ciclos; 30 segundos a 94 °C; 30 segundos a 58 °C; 30 segundos a 72 °C; extensão final a 72 °C por 5 minutos.

Tabela 5. Sequência dos iniciadores utilizados para o gene *GAPDH*.

Iniciadores	Sequência	Fragmento amplificado
<i>Forward</i>	5' – TTT GAA TGG CAA GCT CAC TG – 3'	180 bp
<i>Reverse</i>	5' – GGT GGA AAC CAA ATC CTC CT – 3'	

4.8. Análise de expressão por RT-qPCR

Para avaliar a expressão do gene *DDM1*, do elemento de transposição TE010 e do *GAPDH* utilizado como controle, em cada amostra coletadas dos subcultivos (R₀, R₁, R₄) foram avaliadas pelo método de PCR em tempo real (RT-qPCR). Cada reação foi composta por 6,5 µL de 2x SYBR[®] Green Master Mix; 0,5 pmol de cada iniciador; 125 ng de cDNA sintetizado de cada amostra, sendo um volume final de 12,5 µL. As condições da corrida seguiram o seguinte protocolo: 55 °C por 2 minutos; 95 °C por 10 minutos; 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos; 60 °C por 1 minuto e 1 ciclo de 95 °C por 15 segundos; 60 °C por 15 segundos e 95 °C por 15 segundos para produzir a curva de dissociação, os iniciadores utilizados para avaliar a expressão de cada elemento estão demonstrados na Tabela 6.

Foi utilizado o equipamento Step One Plus[®] (Thermo Fisher Scientific), e os dados de eficiência para cada curva produzida foram analisados pelo software Lin Reg PCR[®] 11.6.

Tabela 6. Sequência dos iniciadores utilizados no RT-qPCR.

Elemento	Iniciadores	Sequência	Fragmento amplificado
<i>DDM-1</i>	<i>Forward</i>	5' –GCT CTT GAC GCA AAC TCA GCT C – 3'	121 pb
	<i>Reverse</i>	5' – GCG TCC ACG ACC AGT CTT C – 3'	
<i>TE010</i>	<i>Forward</i>	5' – GAT CGA CCT CCA CTT TGT CC – 3'	142 pb
	<i>Reverse</i>	5' – GTT GAG GTT GGA GCG AAA CT – 3'	
<i>GAPDH</i>	<i>Forward</i>	5' – TTT GAA TGG CAA GCT CAC TG – 3'	180 pb
	<i>Reverse</i>	5' – GGT GGA AAC CAA ATC CTC CT – 3'	

4.9. Análise de metilação do elemento de transposição TE010

Para verificar se o gene *DDM1* está relacionado com a metilação em cana-energia, foi avaliado a ocorrência de metilação no elemento de transposição TE010.

Para fazer esta análise, foram coletadas amostras de calos nas fases dos subcultivos R₀, R₁ e R₄ dos eventos E7 e E8 da variedade Vx12-1003 e os eventos E2 e E3 da variedade Vx12-0277, o DNA dessas amostras foram extraídos seguindo o método CTAB e em seguida tratado com o Kit MethylCode™ Bisulfite Conversion para observação da ocorrência de metilação. Este método consiste em tratamento do DNA com bissulfito, desta forma, as citosinas não metiladas são convertidas em uracila, enquanto as citosinas metiladas permanecem inalteradas. O DNA modificado com bissulfito é amplificado por PCR e os produtos resultantes analisados por sequenciamento de DNA. O perfil de metilação do segmento de DNA é determinado comparando a sequência do DNA tratado com bissulfito com a sequência do DNA não tratado (Frommer et al., 1992).

Os iniciadores utilizados para essa análise foram desenhados no programa *MethPrimer*, que é específico para análises de metilação. Os iniciadores para o TE010 foram desenhados segundo a sequência fornecida no *GenBank* (NCBI), número de acesso DQ115018.1. O próprio programa seleciona quais regiões da sequência no TE010 onde ocorre a metilação, que são representados por ilhas CpGs (Figura 6) (Li and Dahiya, 2002).

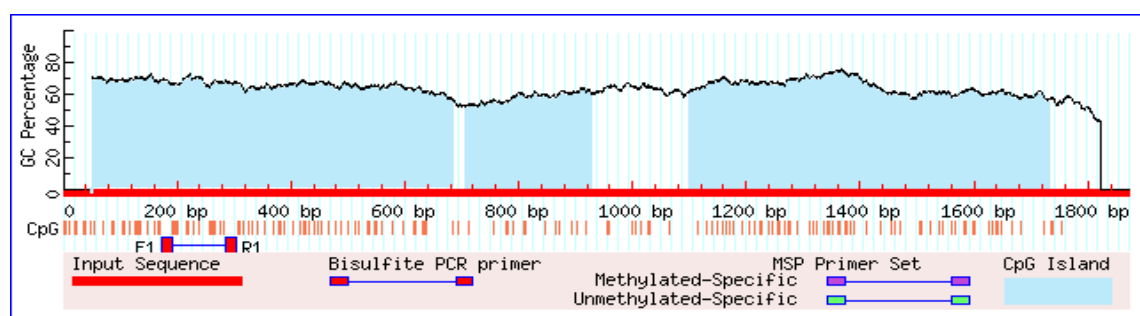


Figura 6. Sequência do elemento de transposição TE010 demonstrando as ilhas CpGs. Se observa três regiões CpGs em azul, a ilha 1 com um fragmento de 636 pb, a ilha 2 com 224 pb e a ilha 3 com fragmento de 633 pb. A Figura foi adaptada do site http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer2/MethPrimer_result.cgi.

Os iniciadores foram desenhados na sequência da Ilha 1 e da Ilha 2, e analisados quanto a T_m (Temperatura de *melting*), formação de dímeros (*self-dimers*) e a formação de estruturas secundárias (*hairpins*) pelo software Oligo Analyzer Tool (Integrated DNA Technologies) (Tabela 7).

Tabela 7. Sequência dos iniciadores utilizados na análise de metilação do TE010 por PCR.

Iniciadores	Sequência	Fragmento amplificado	CpGs
Ilha 1 - <i>Forward</i>	GGTAAGTGGATTTGGATTTATAAG	383pb	37
Ilha 1 - <i>Reverse</i>	ATAAACCCCAAAAATCAACAAAAAAC		
Ilha 2 - <i>Forward</i>	GGGTTTATGGAGGTTAAGTTTGATA	289pb	15
Ilha 2 - <i>Reverse</i>	AAAAATTACAATCAATCATCCCAAC		

4.1. Sequenciamento do elemento de transposição TE010 tratado com bissulfito

O sequenciamento Sanger de segmentos do elemento de transposição TE010 foi realizado para verificação da metilação na Ilha2 utilizando os iniciadores da Tabela 7. Não foi possível analisar a Ilha3, pois o programa *MethPrimer* segue o parâmetro que quando há uma sequência de mais de cinco nucleotídeos repetidos não é possível desenhar iniciadores. A Ilha 1 também não foi possível realizar o sequenciamento, pois na análise de PCR surgiram bandas inespecíficas. Para essa técnica utilizou o sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems) com ET Dye-Terminators, seguindo os protocolos estabelecidos pelo Laboratório de Biologia Molecular de Plantas e Genômica de Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ/USP. Para avaliar as sequências obtidas de cada amostra foi utilizado o software MEGA X (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version X*) (Kumar, et al., 2018).

Para avaliar os níveis de metilação do retrotransposon TE010 em cada amostra, os resultados do sequenciamento foram analisados no software BISMIA (*Bisulfite Sequencing DNA Methylation Analysis*) (Rohde, et al. 2010).

4.2. Análise estatística

A análise dos dados obtidos foi realizada pela análise de variância (ANOVA) e o Teste de Tukey (Tukey, 1949). O software utilizado para fazer as análises estatísticas foi o JASP (JASP Team, 2019).

5. RESULTADOS

5.1. Cultura de tecidos

5.1.1. Geração de calos embriogênicos da cana-energia

Para determinar quais das variedades utilizadas, Vx12-0277, Vx12-1003, Vx12-1022, Vx12-1191, Vx12-1658 e Vx12-1744 poderiam gerar maior quantidade de calos embriogênicos em meio de cultura MS3K, foram realizadas 05 inoculações para cada uma das variedades. Em cada placa de meio de cultura foram introduzidos 15 discos foliares, com o intuito de avaliar quantos calos embriogênicos seriam obtidos no último subcultivo (R₄) para cada disco foliar introduzido no meio de cultura (Figura 7).

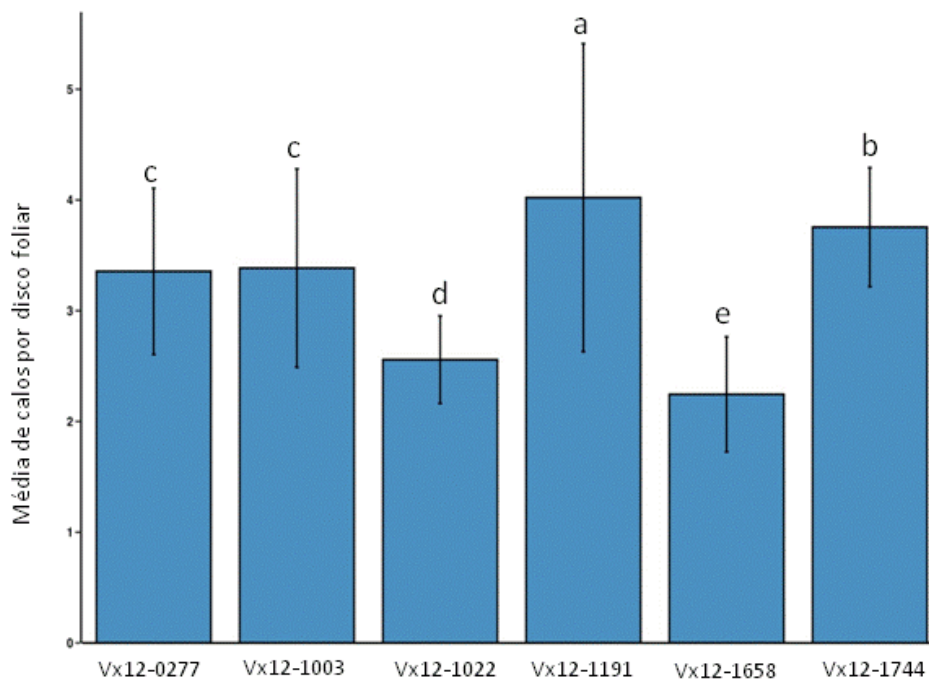


Figura 7. Média de formação de calos embriogênicos. As variedades Vx12-0277, Vx12-1003, Vx12-1022, Vx12-1191, Vx12-1658 e Vx12-1744 foram analisadas no subcultivo R₄. A análise estatística refere-se a média da quantidade total de calos embriogênicos obtidos por disco foliar introduzido no subcultivo R₀. Análise estatística ANOVA e teste Tukey.

A variedade que apresentou maior quantidade de calos embriogênicos por disco foliar foi a Vx12-1191 com a média de 4,0 calos por disco, seguida da Vx12-1744 com 3,8 calos embriogênicos por disco foliar. As variedades Vx12-0277 e Vx12-1003 tiveram o mesmo resultado, aproximadamente 3,5 calos por disco foliar. Já as variedades Vx12-1022 e Vx12-1658 apresentaram a menor quantidade de calos produzidos, sendo 2,5 e 2,2 calos por disco foliar, respectivamente. Como observado houve variação estatística entre as variedades estudadas, exceto entre a Vx12-0277 e Vx12-1003.

5.1.2. Oxidação de calos na cultura de tecidos

A oxidação dos tecidos que ocorre no decorrer dos subcultivos na cultura de tecidos, tem grande influência nos resultados de formação dos calos embriogênicos. Para fazer a análise referente ao nível de oxidação em cada subcultivo R₀, R₁, R₂ e R₃, foram realizadas 05 inoculações para cada variedade, Vx12-1003, Vx12-0277, Vx12-1022, Vx12-1191, Vx12-1744 e Vx12-1658.

A avaliação dos calos foi feita de maneira comparativa entre as placas com os calos, dando uma nota de zero a cinco, sendo cinco quando o calo estava totalmente oxidado e zero quando não ocorria oxidação nos calos. A média dos resultados estão apresentados na Figura 8.

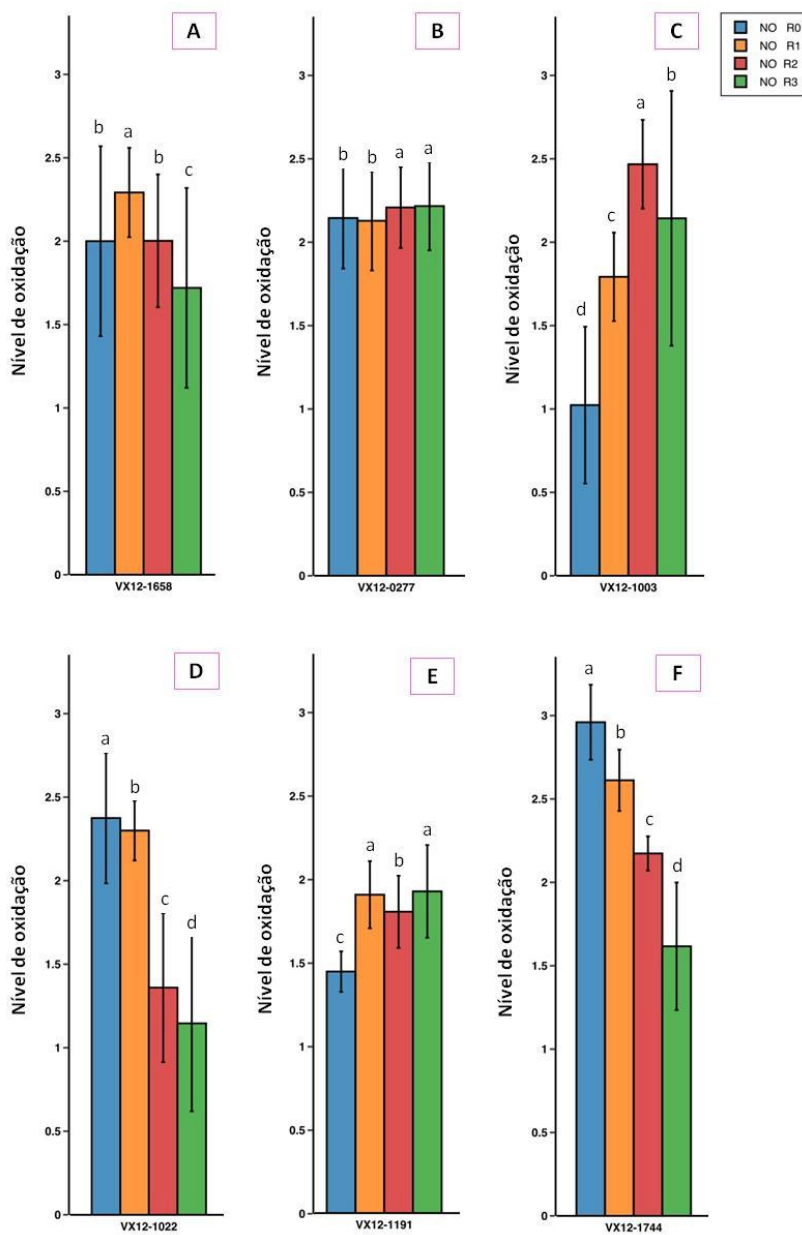


Figura 8. Média do nível de oxidação dos calos em cada subcultivo das variedades. Gráficos: (A) Vx12-1658; (B) Vx12-0277; (C) Vx12-1003; (D) Vx12-1022; (E) Vx12-1191; (F) Vx12-1744, sendo R₀ coluna azul, R₁ coluna laranja, R₂ coluna vermelha e R₃ coluna verde, nível de oxidação (NO). Análise estatística ANOVA e teste Tukey.

As variedades Vx12-1022 (Figura 8 - D), Vx12-1744 (Figura 8 - F) e Vx12-1658 (Figura 8 - A) apresentaram nível de oxidação decrescente no decorrer dos subcultivos. Apesar de aparentar ser um bom resultado, isso não significou que estas variedades tiveram a maior produção de calos embriogênicos, pois a perda de discos foliares no subcultivos R₀ devido à oxidação resultou na redução de material vegetal para produção de calos.

As variedades Vx12-1003 (Figura 8 - C) e Vx12-1191 (Figura 8 – E) apresentaram no subcultivo R₀ menor nível de oxidação. Devido ter preservado maior quantidade de discos foliares sem oxidação, essas variedades deveriam resultar em maior média de calos embriogênicos, mas continuaram a apresentar oxidação nos subcultivos seguintes. Apesar do nível de oxidação ser crescente para a variedade Vx12-1191, ela resultou na maior média de formação de calos (4,0). Somente a variedade Vx12-0277 (Figura 8 – B) não apresentou variação no nível de oxidação entre os subcultivos. Já a variedade Vx12-1744 apresentou nível de oxidação decrescente durante os subcultivos e resultou na segunda melhor média de formação de calos (3,8).

Os motivos para esse resultado de diferenças no nível de oxidação entre as variedades na fase R₀ podem ter sido ocasionados pelo estresse durante o processo de introdução na cultura de tecidos, que ocorre desde a coleta do material no campo, a etapa de assepsia dos palmitos no etanol 70% e no preparo dos discos foliares, onde é necessário fazer cortes no tecido vegetal. Quanto às variações no nível de oxidação durante os subcultivos deveriam tender a decrescer, pois somente são selecionadas as regiões sem oxidação nos subcultivos, mas possivelmente a divisão dos calos para que mantenham em dimensões uniformes podem interferir na oxidação. Estes resultados demonstram que o nível de oxidação é o principal fator limitante no processo de formação de calos embriogênicos num meio de cultura já estabelecido.

5.1.3. Regeneração de plantas

Para avaliar quais das variedades em estudo Vx12-0277, Vx12-1658, Vx12-1022, Vx12-1191, Vx12-1003 e Vx12-1744 teriam maior eficiência em regeneração de plantas, foram realizados três experimentos totalizando 30 calos embriogênicos por variedade. Os calos foram transferidos para o meio de regeneração MRP que consiste do meio MS suplementado com 0,45 mg.L⁻¹ BAP e 0,1 mg.L⁻¹ ANA, sendo mantidos no fotoperíodo de 16horas de luz e 8 horas de escuro a 26 °C ± 2 °C, num período de 40 dias, após esse período avaliou quantos calos regeneraram plantas (Tabela 8).

Tabela 8. Regeneração de plantas por calos embriogênicos.

Variedade	Nº de calos	Plantas regeneradas	Eficiência de regeneração
Vx12-1022	30	14	46 %
Vx12-1003	30	19	63 %
Vx12-1191	30	27	90 %
Vx12-1658	30	11	36 %
Vx12-0277	30	20	66 %
Vx12-1744	30	25	83 %

As variedades que obtiveram maior eficiência de regeneração foi a Vx12-1191 com 90% e a Vx12-1744 com 83%, já a Vx12-1658 apresentou o menor percentual de regeneração de plantas correspondendo a 36%, seguida da Vx12-1022 com 46%. As variedades Vx12-0277 e Vx12-1003 apresentaram pouca diferença entre elas, correspondendo 66% e 63%, respectivamente.

A eficiência de regeneração pode estar relacionada com desenvolvimento de calos embriogênico, pois as variedades que apresentaram a maior quantidade de calos embriogênicos por disco foliar, a Vx12-1191 média de 4,0 calos e a Vx12-1744 com a média de 3,8 calos por disco foliar, também apresentaram as maiores eficiências de regeneração. Entretanto, para os experimentos de transformação genética foram utilizadas as variedades Vx12-1744, Vx12-1003 e Vx12-0277 por apresentarem taxa de regeneração acima de 60% e terem características agrônômicas no campo de interesse.

5.2. Transformação genética de cana-energia

5.2.1. Transformação por biolística com o gene *DDM1*

Com o objetivo de obter plantas transgênicas com o gene *DDM1* para avaliar a estabilidade do genoma dessas plantas pela redução da atividade do retrotransposon TE010, foram selecionadas as variedades Vx12-1003, Vx12-0277 para os experimentos de transformação genética, por terem apresentado média de formação de calos embriogênicos entre 3,5 a 3,8 e eficiência de formação de calos de 63% e 66%, respectivamente e características de campo desejáveis.

Para a transformação por biolística foram utilizados calos embriogênicos, os quais foram co-transformados com o plasmídeo pEP10 contendo o gene *DDM1* e o plasmídeo pHA9 contendo o gene *neo* (Picelli, 2010).

Desde que as plantas de cana-de-açúcar se desenvolvem em touceiras, após duas a três subculturas, as plantas de cada touceira foram individualizadas e o PCR foi realizado em plantas individuais advindas de cada touceira. Cada touceira é um evento de transformação.

Os calos transformados foram transferidos para o meio de cultura MRP que induz a regeneração. Este meio contém 30 mg. L⁻¹ de geneticina que é utilizada para seleção das plantas transgênicas. Os calos embriogênicos foram mantidos em fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro. É nesta fase quando ocorre uma grande influência do antibiótico na seleção dos possíveis calos que resultam em plantas transgênicas formando pequenas touceiras de plantas (Figura 9 – A e B). No entanto, somente pode ser que somente algumas plantas das touceiras sejam resistentes ao antibiótico, sendo transgênicas (Figura 9 - C), enquanto outras (não transgênicas) não se desenvolvem (Figura 9 - D).

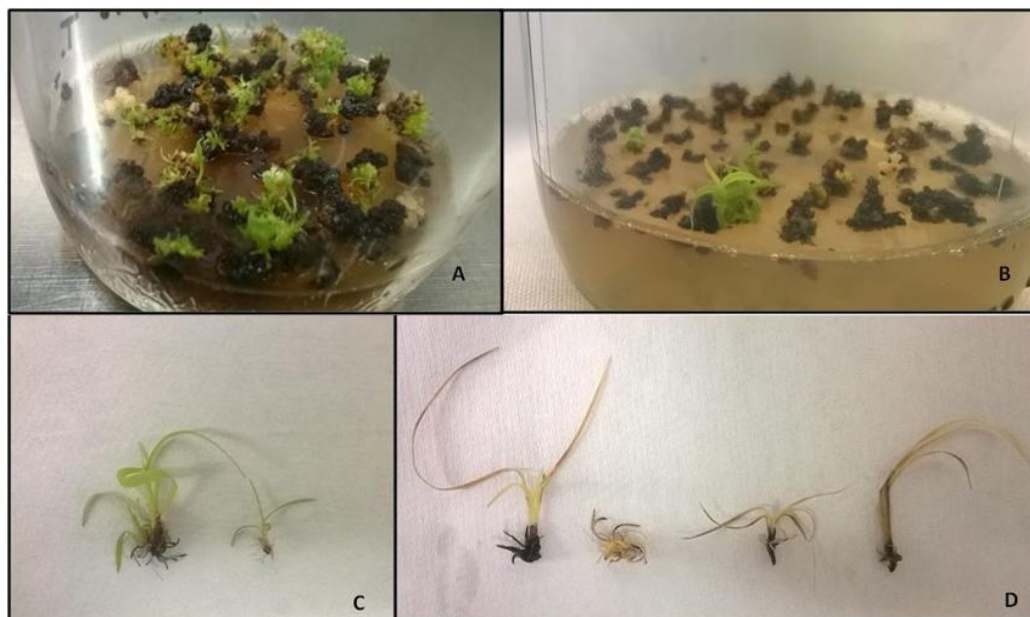


Figura 9. Regeneração de plântulas *in vitro*. As figuras (A e B) representam o primeiro subcultivo para regenerar os calos embriogênicos que passaram pelo processo de transformação, o meio de cultura de regeneração de calos contém geneticina (30 mg. L⁻¹). As figuras (C e D) representam o terceiro subcultivo onde apresentam o estágio de plântula.

Os eventos foram considerados não transgênicos quando as plântulas atingiam o segundo ou terceiro subcultivos e começavam a ficar com as folhas amareladas ou não apresentavam formação de raiz. A decorrência da morte das plântulas pode ter sido devido o gene *neo* não ter sido inserido e expresso no genoma que resulta na sensibilidade ao antibiótico que se tornou tóxico ou várias cópias do gene pode ter sido inserido no genoma gerando alguma anomalia ou as touceiras podem funcionar como ‘filtro’ mantendo as plântulas falsas positivas vivas, quando essas plântulas são individualizadas ficam mais expostas ao antibiótico e por não conterem o gene de resistência acabam morrendo.

Na Tabela 9 está demonstrando o número de calos embriogênicos transformados das variedades Vx12-1003 e Vx12-0277, a quantidade de eventos regenerados a partir de cada transformação e o número de eventos positivos para o gene *DDM1* na análise de PCR.

Tabela 9. Eficiência transformação genética por biolística dos calos embriogênicos das variedades Vx12-1003 e Vx12-0277 com os genes *DDM1* e *neo*.

VARIETADE	QUANTIDADE DE CALOS	QUANTIDADE DE EVENTOS	EVENTOS COM PCR +	EFICIÊNCIA DE TRANSFORMAÇÃO
Vx12-1003	600	8	3	0,5 %
Vx12-1003	1302	15	0	0 %
Vx12-0277	1536	13	0	0 %
Vx12-0277	1262	15	3	0,23 %
Vx12-0277	1672	24	0	0 %
Vx12-0277	1152	12	0	0 %
Vx12-0277	1000	4	1	0,1 %

Para avaliar se havia ocorrido a inserção do gene *DDM1* nas plantas regeneradas da variedade Vx12-0277, foram coletadas amostras das plantas *in vitro* individualizadas das touceiras. Desses quinze eventos, três apresentaram plantas positivas para o gene *DDM1* (Figura 10).

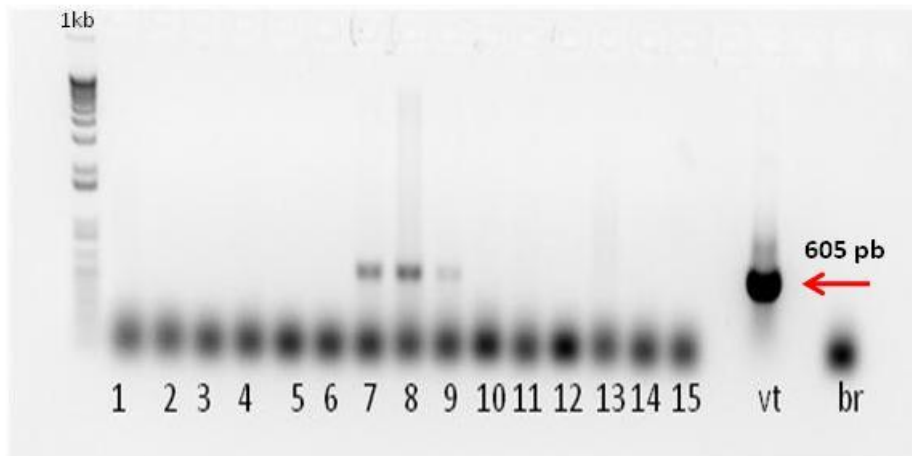


Figura 10. Gel de agarose 1% com as amostras de DNA isolado de plantas da variedade Vx12-0277. Cada amostra representa uma planta diferente. O controle positivo foi o vetor pE010 (vt) e para o controle negativo foi utilizado a água (br). O tamanho do fragmento esperado é de 605 pb.

Da variedade Vx12-1003 foram coletadas vinte e três plantas dos dois experimentos de transformação diferentes realizados. Foram identificados três eventos positivos (Figura 11).

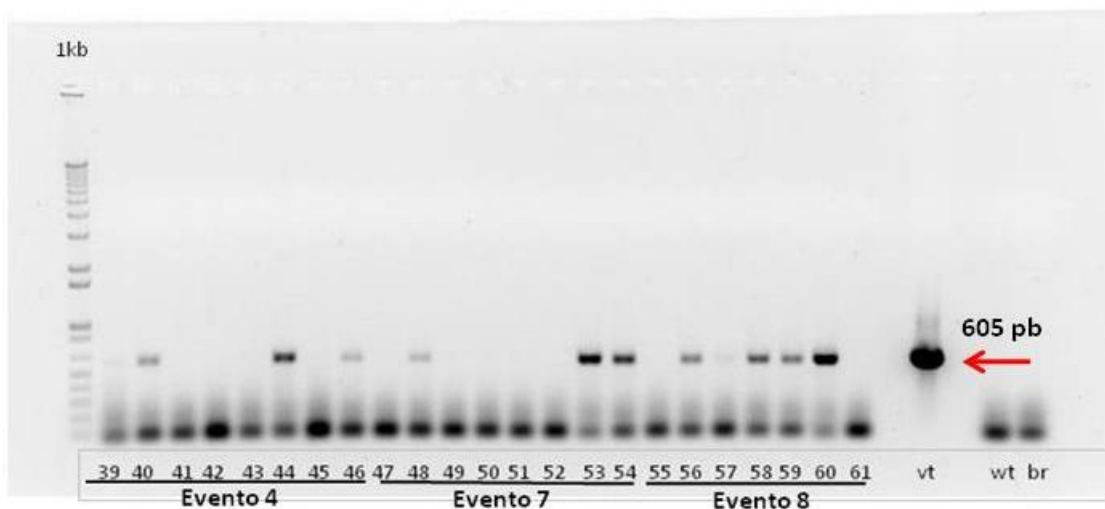


Figura 11. Gel de agarose 1% com as amostras de DNA da variedade Vx12-1003. As amostras de plantas individualizadas 39 a 46 são referentes ao Evento 4; as amostras de 47 a 54 pertencem o Evento 7 e as amostras 55 a 61 pertencem ao Evento 8. O controle positivo foi o vetor pEP10 (vt) e os controles negativos foram a água (br) e a planta não transgênica (wt). O tamanho do fragmento do gene *DDM1* é de 605 pb.

As plantas identificadas como transgênicas de cada evento das variedades Vx12-1003 e Vx12-0277 foram multiplicadas *in vitro*, no meio de cultura MS contendo 30 mg.L⁻¹ de geneticina. Após adquirirem tamanho de aproximadamente 12 cm, passaram pelo processo de aclimatização e foram introduzidas na casa de vegetação.

5.2.2. Transformação *via Agrobacterium* com o gene *AtBI-1*

Foram conduzidos no total 14 experimentos de transformação *via Agrobacterium* utilizando o plasmídeo *AtBI-1*_RR, sendo 8 experimentos com as variedades Vx12-1744 e 6 com a variedade Vx12-0277. Os experimentos conduzidos com a variedade Vx12-0277 totalizaram 760 calos embriogênicos transformados, no entanto, houve uma alta proliferação de agrobactéria nos calos não ocorrendo regeneração de plantas.

Dos oito experimentos realizados com a variedade Vx12-1744 foram transformados um total de 1434 calos embriogênicos. Em três experimentos não se obteve resultado de regeneração de plantas por também ter ocorrido grande proliferação da agrobactéria no meio de cultura e nos calos. No entanto, cinco experimentos resultaram em regeneração de plantas que foram analisadas por PCR para confirmação da inserção do gene *AtBI-1*. Foram analisadas plantas de 37 eventos obtidos a partir desses experimentos (Figura 12).

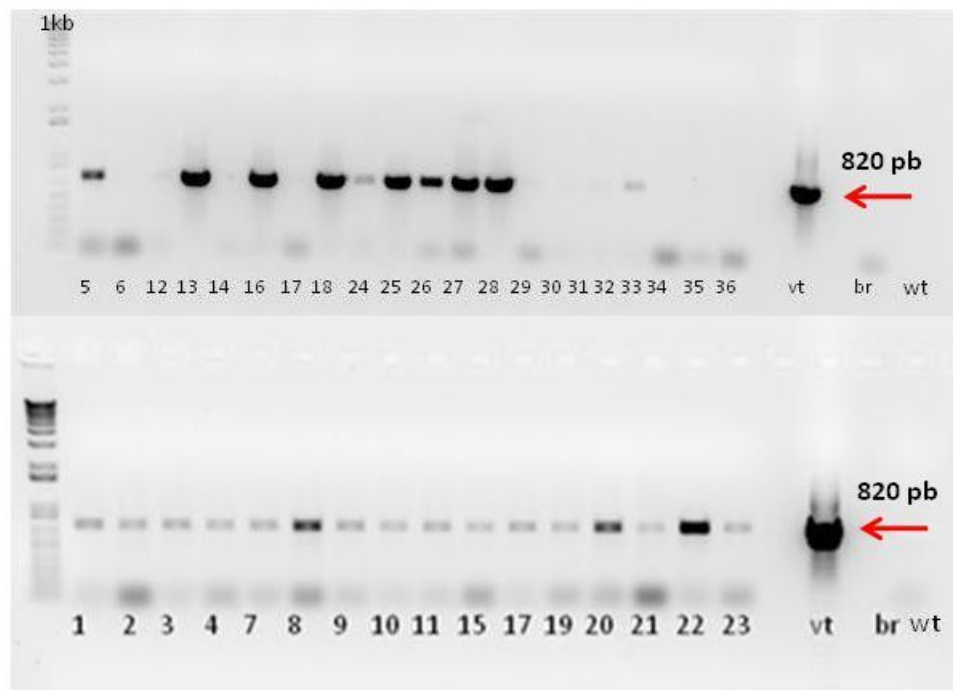


Figura 12. Gel de agarose 1% para confirmação da inserção do gene *AtBI-1* nas amostras pertencentes a variedade Vx12-1744. Controle positivo; vetor pDM9 (vt). Controles negativos: água (br) e planta não transgênica (wt). Tamanho do fragmento esperado 820 pb.

Para se certificar que o gene *AtBI-1* estava inserido no genoma da cana *in vitro* e confirmar que não houve contaminação do DNA da planta com a agrobactéria, foi realizado uma análise de PCR com o gene *VirG* que está presente somente na *A. tumefaciens*. A presença do gene *VirG* indica que existe a presença da *A. tumefaciens* e a planta pode não ser transgênica, já que o gene *AtBI-1* identificado pela análise de PCR pode não ser o gene inserido no genoma da cana, mas sim o gene que está no plasmídeo da *Agrobacterium*. Assim, para os eventos positivos para o gene *AtBI-1* foi realizado uma nova análise de PCR com o gene *VirG* para se certificar que as plantas não apresentavam a presença da *Agrobacterium* (Figura 13).

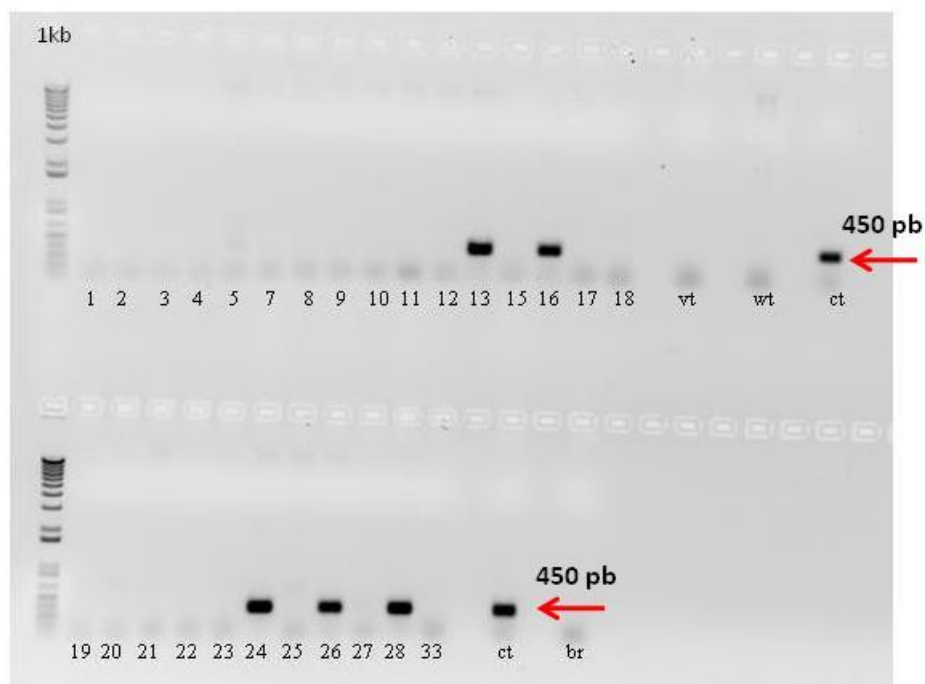


Figura 13. Reação de PCR para confirmação da sequência do gene *VirG* de *Agrobacterium* EHA105 nas plantas Vx12-1744 que tiveram confirmação da inserção do gene *AtBI-1*. Controle positivo; EHA105 (ct). Controles negativos: água (br) e planta não transgênica (wt). O tamanho do fragmento esperado é de 450 pb.

Desses 37 eventos analisados da variedade Vx12-1744, 27 apresentaram PCR positivo para o gene *AtBI-1* e cinco deles apresentaram o fragmento referente ao gene *VirG* no gel de agarose (Figura 12) sendo esses eventos o 13, 16, 24, 26 e 28. Assim, totalizou-se 22 eventos confirmados com o gene *AtBI-1*.

Na Tabela 10 está demonstrando a eficiência de transformação via *Agrobacterium* com o gene *AtBI-1* utilizando as variedades Vx12-1744 e Vx12-0277, sendo a quantidade de calos transformados, a quantidade de eventos regenerados e quantos eventos confirmaram a inserção do gene *AtBI-1* pela análise de PCR.

Tabela 10. Eficiência de transformação via *Agrobacterium* das variedades Vx12-0277 e Vx12-1744.

VARIEDADE	QUANTIDADE DE CALOS	QUANTIDADE DE EVENTOS	EVENTOS COM PCR +	EFICIÊNCIA DE TRANSFORMAÇÃO
Vx12-1744	1434	37	22	1,53 %
Vx12-0277	760	0	0	0 %

As plantas provenientes dos eventos confirmados foram aclimatizadas e transferidas para a casa de vegetação. Após 3 a 4 meses, foi realizada novamente a análise de PCR para se certificar que o gene *AtBI-1* ainda estava presente no genoma das plantas de cana-energia. Algumas plantas foram selecionadas para coleta de gemas que foram plantadas na estação experimental da empresa BioVertis Produção Agrícola LTDA em Alagoas para serem realizados testes em campo.

5.2.3. Retransformação das plantas com o gene *DDM1* via *Agrobacterium* com o gene *AtBI-1*

Com o objetivo de analisar a estabilidade do transgene *AtBI-1* em plantas contendo o gene *DDM1*, discos foliares de plantas das variedades Vx12-1003 e Vx12-0277 da casa de vegetação já confirmadas positivas para o gene *DDM1* foram reintroduzidas na cultura de tecidos para obtenção de calos embriogênicos. Os calos obtidos foram retransformados *via Agrobacterium* com o plasmídeo pCAMBIA 0380 *AtBI-1*_RR (Figura 2). Os calos retransformados da variedade Vx12-0277 não regeneraram plantas, devido ao grande crescimento da agrobactéria no meio de cultura que não pôde ser controlado mesmo com a adição de Timentin® no meio de cultura, usado para controlar o crescimento da agrobactéria. Os calos retransformados da variedade Vx12-1003, 24 deles regeneraram plantas (eventos) que foram analisadas por PCR para o gene *AtBI-1* (Figura 14).

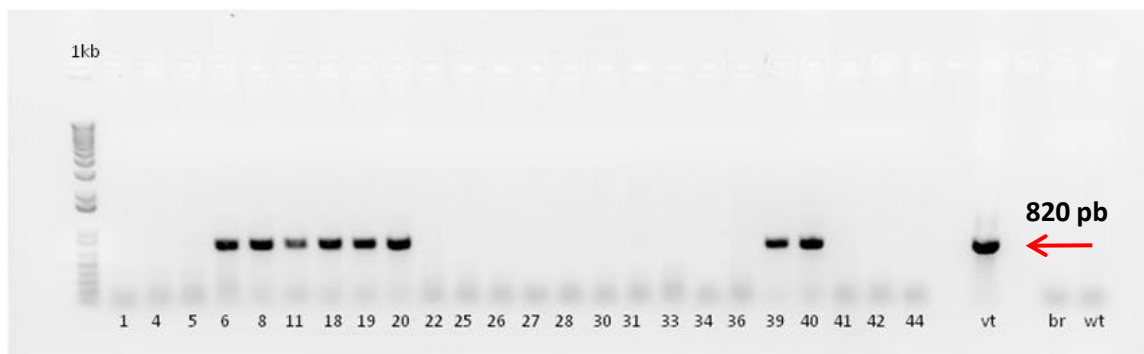


Figura 14. Gel de agarose da reação de PCR com o gene *AtBI-1* em eventos da variedade Vx12-1003-*DDM1*. Controle positivo; vetor pDM9 (vt). Controles negativos: água (br) e planta não transgênica (wt). O tamanho do fragmento esperado é de 820 pb.

Os eventos que deram positivo para o gene *AtBI-1* foram analisados novamente por PCR para confirmar se ainda continham o gene *DDM1* e se não havia contaminação das plantas com agrobactéria utilizando iniciadores para o gene *VirG* (Figura 15). Apesar dos eventos terem apresentado resultados positivos na reação de PCR para os genes *DDM1* e *AtBI-1* também apresentaram bandas referentes ao gene *VirG*.

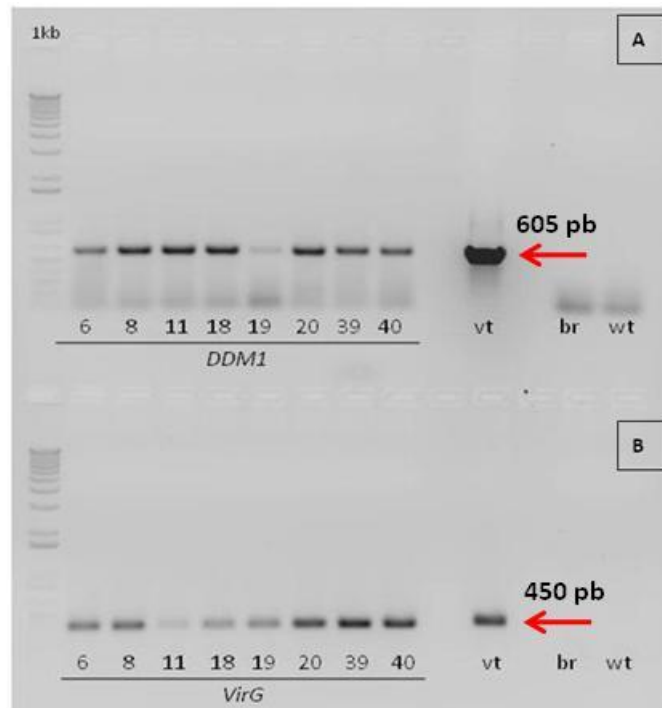


Figura 15. Gel de agarose 1% com as reações de PCR dos eventos da variedade Vx12-1003-DDM1. A: Para o gene *DDM1*, foi usado como controle positivo o vetor pE010 (vt) e como controle negativo foram usados água (br) e a planta não transgênica (wt). O tamanho do fragmento esperado é de 605 pb. B: Para o gene *VirG*, DNA de *A. tumefaciens* EHA105 foi usado como controle positivo. O tamanho do fragmento esperado é de 450pb.

Apesar do interesse de se obter a análise da expressão de plantas *DDM1* transformadas com o gene *AtBI-1*, para observar se o gene *DDM1* aumentaria a estabilidade do gene *AtBI-1*, não foi obtido plantas confirmadas com a presença dos dois transgenes. É sugerido que esse experimento seja repetido futuramente, pois não houve tempo suficiente para ser repetido nesse trabalho devido necessitar de aproximadamente 6 meses, para que se pudesse realizar a reintrodução das plantas na cultura de tecidos para obtenção de calos embriogênicos suficientes para a transformação genética com o gene *AtBI-1*.

5.3. Avaliação da expressão do gene *DDM1* e do elemento de transposição TE010

Para avaliar se o gene *DDM1* estaria atuando no silenciamento de elementos de transposição, foi definido o elemento de transposição TE010, pois em um estudo com cana-de-açúcar apresentou alta atividade em calos (Araújo, et al., 2005). Plantas cana-energia transgênicas mantidas na casa de vegetação passaram pelo processo de inoculação e reintrodução na cultura de tecidos utilizando o meio MS3K. Para confirmação de que todo material introduzido possuía o gene *DDM1*, foram feitos PCR. Foram coletadas amostras de cada subcultivo R₀, R₁, R₂, R₃ R₄ e P (planta) dos eventos E8 e E7 da variedade Vx12-1003 e os eventos E2 e E3 da variedade Vx12-0277 (Figura 2). Estas amostras foram coletadas durante a obtenção de calos embriogênicos das plantas transgênicas-*DDM1* usadas para o experimento de transformação com o gene *AtBI-1* do resultado anterior. A expressão do gene *DDM1* e do elemento de transposição TE010 nos calos de cana-energia, foi feita nas fases de subcultivo R₀, R₁ e R₄, sendo essas amostras pertencentes aos eventos 7 e 8 da variedade Vx12-1003, e dos eventos 2 e 3 da variedade Vx12-0277.

5.4. Avaliação da qualidade do cDNA com o gene *GAPDH*

O RNA extraído das amostras da Vx12-1003 e Vx12-0277, foram utilizados para fazer a síntese de cDNA. Para avaliar a qualidade do cDNA sintetizado, foi realizada uma análise de PCR com os iniciadores do gene *GAPDH* (Figura 16).

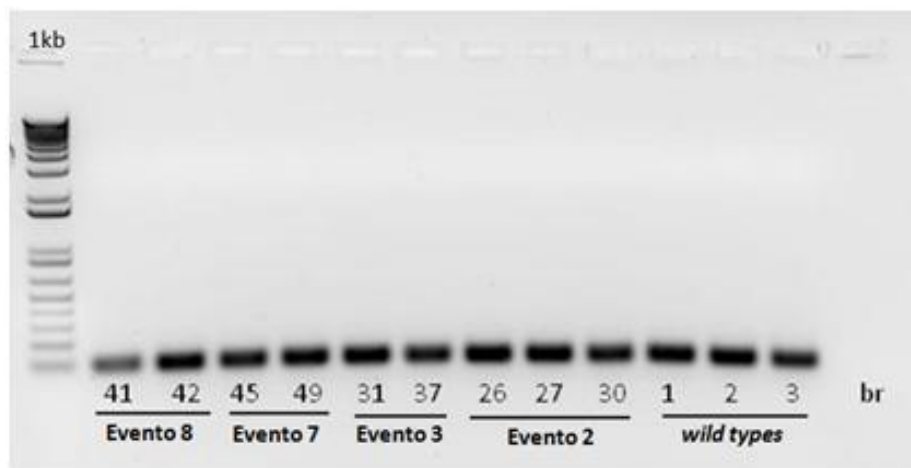


Figura 16. Análise de PCR com o gene *GAPDH* em gel de agarose 1%, com as amostras de cDNA de calos na fase R₀ do subcultivo das variedades Vx12-1003 e Vx12-0277. Amostras 41 e 42 pertencem ao evento 8 da Vx12-1003; 45 e 49, pertencem ao evento 7 da Vx12-1003; Amostras 31 e 37 pertencem ao evento 3 da Vx12-0277; amostras 26, 27 e 30 pertencem ao evento 2 da Vx12-0277; amostras 1, 2 e 3 são plantas não transgênicas da variedade Vx12-0277. No controle negativo foram usados água (br). Tamanho do fragmento esperado foi de 180 pb.

5.5. Expressão do gene *DDM1* e do TE010 em RT-qPCR

O cDNA sintetizado das amostras dos eventos E8 e E7 da variedade Vx12 -1003 e os eventos E2 e E3 da variedade Vx12-0277 e de plantas controle não transgênicas foram avaliados quanto a expressão do gene *DDM1* e do elemento de transposição TE010. Com os dados obtidos, analisou-se as mudanças relativas na expressão do gene *DDM1* e do elemento de transposição TE010 a partir da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$, que descreve a mudança na expressão do gene alvo em relação a algum grupo de referência, como um controle não tratado (Livak, and Schmittgen. 2001). As avaliações foram realizadas nos subcultivos R₀, R₁ e R₄. Os resultados da expressão estão apresentados nas figuras 17, 18 e 19 a seguir.

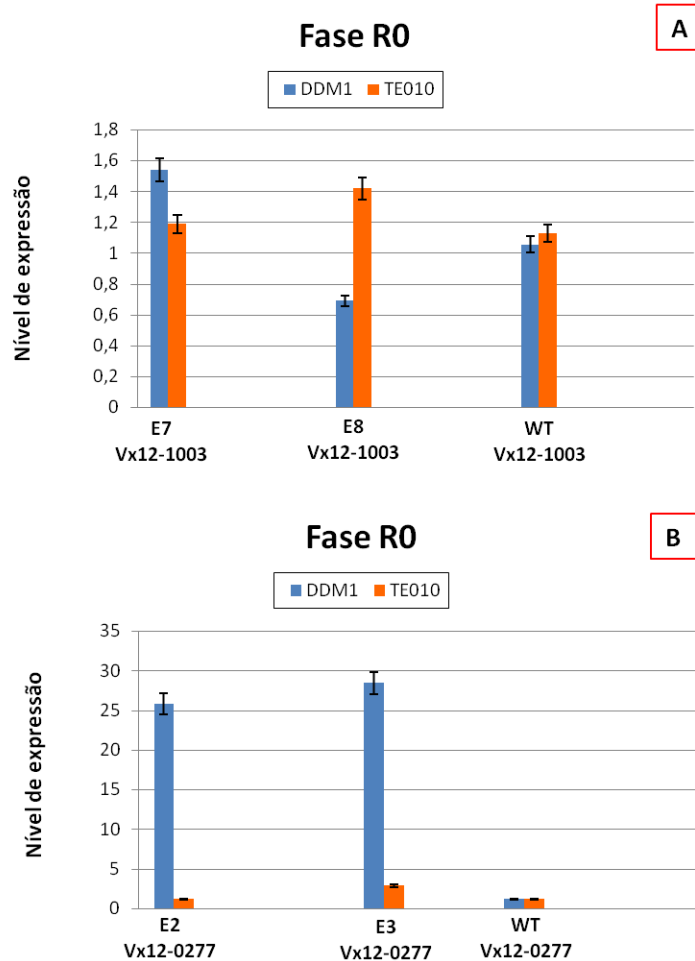


Figura 17. Expressão do gene *DDM1* e do elemento de transposição TE010 em RT-qPCR, na fase de subcultivo R₀. (A) Os eventos E7 e E8 pertencem a variedade Vx12-1003. (B) Os eventos E2 e E3 pertencem a variedade Vx12-0277. Planta não transgênica (WT). A coluna azul se refere ao gene *DDM1* e a coluna laranja ao retrotransposon TE010. Análise estatística ANOVA e teste Tukey.

Na avaliação da expressão do gene *DDM1* nos subcultivos de calos na fase R₀ verificamos diferenças entre os eventos. Na variedade Vx12-1003 o evento E7 apresentou expressão do gene *DDM1* de 1,5 e o evento E8 de 0,7 enquanto o controle não transgênico WT foi de 1,0 (Figura 17-A), nota-se o nível de expressão diferenciado entre os eventos. O E7 apresentou o dobro de expressão em relação ao evento E8. A expressão do retrotransposon TE010 no evento E7 foi de 1,2 e do evento E8 foi de 1,4, enquanto do controle não transgênico foi de 1,1 (Figura 17-A). Apesar da pequena diferença entre eles, observa-se o mesmo padrão de resultado obtido por Picelli, 2010 quando verificou que o gene *DDM1* apresentava alta expressão, a expressão do retrotransposon TE010 era baixa ou vice-versa, demonstrando a relação entre eles, onde o gene *DDM1* influencia a atividade do retrotransposon desde que a expressão destes genes nas plantas controle não transgênicas foram semelhantes.

Este resultado foi mais marcante na variedade Vx12-0277 onde a expressão do gene *DDM1* foi de 25,8 no evento E2 e de 28,4 no evento E3, enquanto nas plantas não transgênicas WT foi de 1,1, estes eventos tiveram expressão relativa maior que 10 vezes comparada ao controle (Figura 17-B) e observa-se que a expressão do retrotransposon TE010 foi de 1,1 para o evento E2, 2,8 para o evento E3 e 1,2 para o controle não transgênico WT (Figura 17-B). Na fase R₀ foi evidente a baixa expressão do TE010 quando a expressão do gene *DDM1* foi alta, e

como observado na variedade Vx12-1003, a expressão do gene *DDM1* e do elemento de transposição TE010 nas plantas não transgênicas controle (WT) foram semelhantes.

Na fase R₁ de desenvolvimento dos calos embriogênicos, a relação entre a expressão do gene *DDM1* e do retrotransposon TE010 foi menor, mas ainda se observa diferença na expressão dos genes e manteve-se o padrão observado na fase R₀, principalmente nos eventos da variedade Vx12-0277. Para a variedade Vx12-1003, a expressão do gene *DDM1* nos eventos E7 e E8 foram de 0,9 e 0,4, respectivamente. Já o controle não transgênico WT apresentou a expressão de 1,0 (Figura 18-A). A expressão observada para o retrotransposon TE010, nos eventos E7 e E8 apresentaram expressão de 1,2 e 0,5, respectivamente e o controle WT de 1,3. (Figura 18 - A). Na variedade Vx12-0277 observou-se que o gene *DDM1* teve maior expressão no evento E2 sendo de 4,5 enquanto no evento E3 foi de 2,8 e o controle WT foi de 1,0, (Figura 18 - B). Por outro lado, a expressão do retrotransposon TE010 nos eventos E2 e E3 foi de 0,9 e 1,4, respectivamente e o controle WT foi de 1,2 (Figura 18 - B). Apesar de menos marcante a diferença de expressão entre o gene *DDM1* e do retrotransposon TE010, observa-se que quando ocorre o aumento da expressão de um gene, ocorre o inverso no outro. Na fase R₁, a expressão do retrotransposon prevaleceu sobre o gene *DDM1* na variedade Vx12-1003, mas na Vx12-0277, a expressão do gene *DDM1* foi maior.

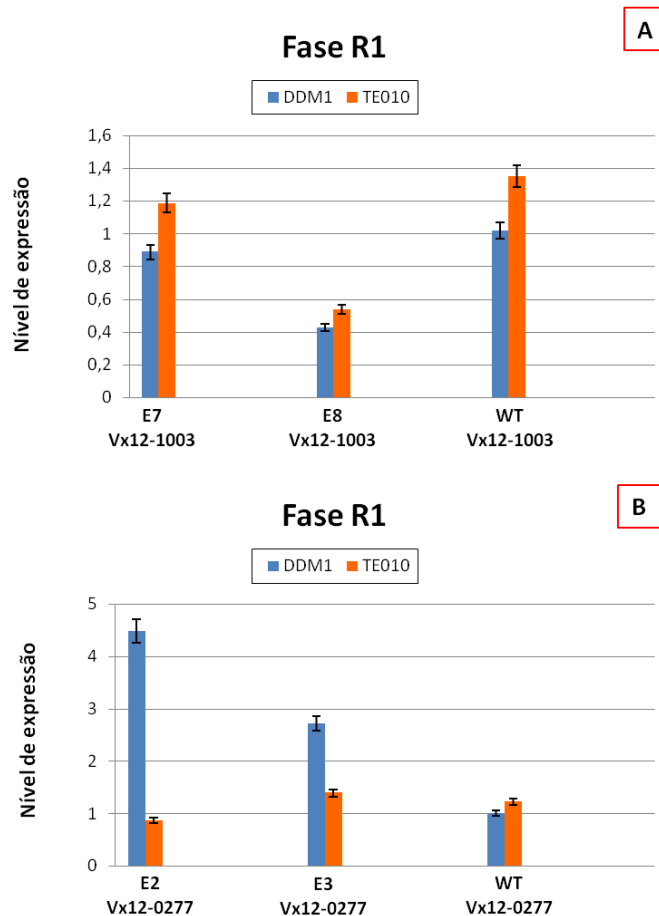


Figura 18. Expressão do gene *DDM1* e do elemento de transposição TE010 em RT-qPCR, na fase de subcultivo R₁. (A) Os eventos E7 e E8 pertencem a variedade Vx12-1003. (B) Os eventos E2 e E3 pertencem a variedade Vx12-0277. Planta não transgênica (WT). A coluna azul se refere ao gene *DDM1* e a coluna laranja ao retrotransposon TE010. Análise estatística ANOVA e teste Tukey.

Na fase R₄ onde o calo embriogênico já se apresentava totalmente desenvolvido, a análise de expressão na variedade Vx12-1003, mostrou que no evento E7 a expressão do gene *DDM1* foi de 5,9 e no evento E8 de 0,2

enquanto o controle WT foi de 1,2 (Figura 19-A). Já para o retrotransposon TE010, a expressão no evento E7 foi de 1,2, do evento E8 foi de 0,9 e do controle WT de 1,2 (Figura 19-A). A análise de expressão dos genes na variedade Vx12-0277 mostrou que para o gene *DDM1*, os eventos E2 e E3 foi de 0,9e o controle de 1,0, no entanto o retrotransposon TE010 apresentou expressão para os eventos E2 e E3 de 0,5 e de 1,0 para o controle não transgênico WT (Figura 19-B). Estes resultados mantêm o comportamento da expressão inversa entre os genes *DDM1* e TE010 nos eventos transgênicos e a similaridade de expressão dos genes nas plantas controle não transgênicas (WT).

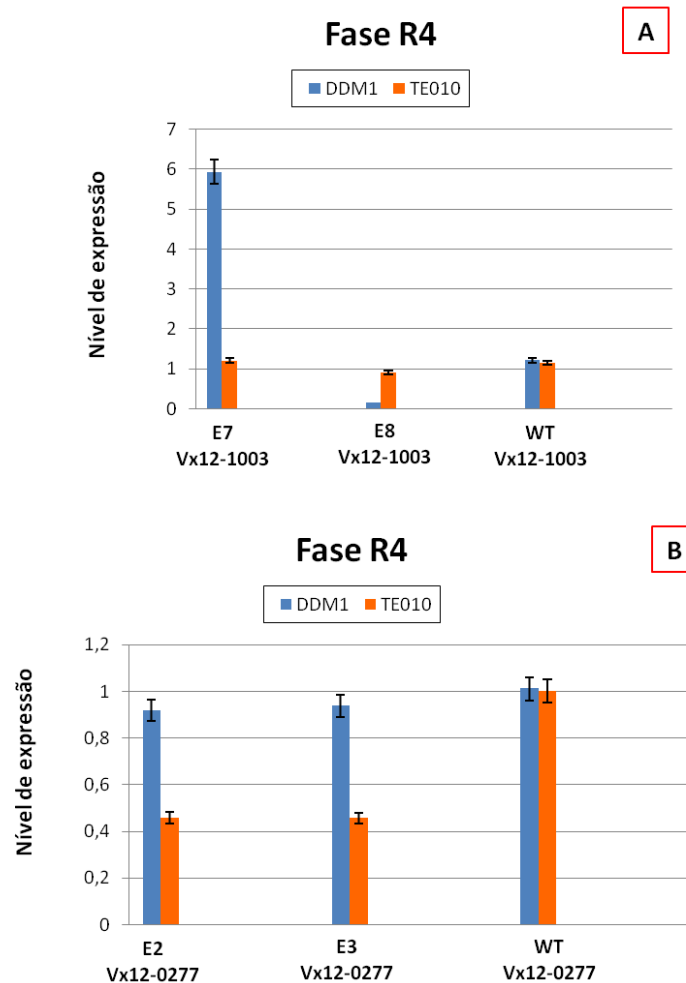


Figura 19. Expressão do gene *DDM1* e do elemento de transposição TE010 em RT-qPCR, na fase de subcultivo R4. (A) Os eventos E7 e E8 pertencem a variedade Vx12-1003. (B) Os eventos E2 e E3 pertencem a variedade Vx12-0277. Planta não transgênica (WT). A coluna azul se refere ao gene *DDM1* e a coluna laranja ao retrotransposon TE010. Análise estatística ANOVA e teste Tukey.

Como esses resultados foram obtidos a partir de material *in vitro*, foi levantada a questão se as plantas por estarem em um ambiente controlado haveria alguma interferência na expressão do gene *DDM1* e do elemento de transposição TE010. Fatores ambientais podem resultar em alterações na maquinaria de controle epigenético, produzindo epialélos que são formados pela presença de elementos de transposição (Schmitz, et al. 2011).

Para verificar se realmente as condições ambientais podem interferir na expressão dos elementos de transposição, foram coletadas amostras das plantas mantidas na casa de vegetação das variedades Vx12-1003

(eventos E7 e E8) e Vx12-0277 (eventos E2 e E3) para avaliação da expressão do gene *DDM1* e do retrotransposon TE010. As amostras foram coletadas em torno das 12 e 13 horas, o período mais quente do dia (Figura 20).

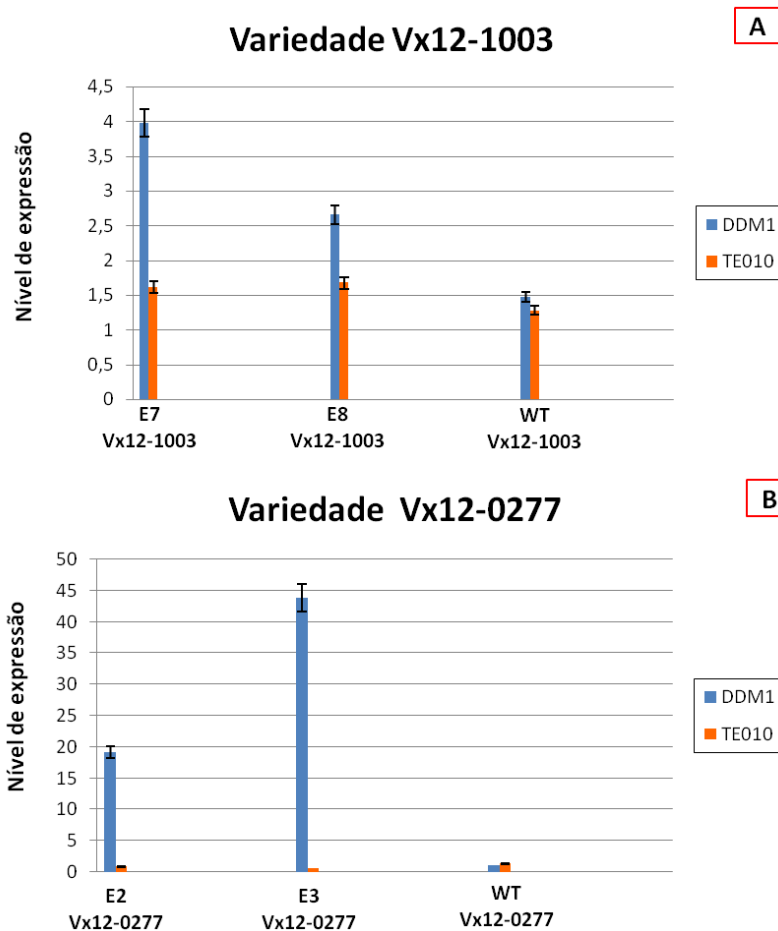


Figura 20. Expressão do gene *DDM1* e do elemento de transposição TE010 em plantas mantidas na casa de vegetação. (A) Os eventos E8 e E7 da variedade Vx12-1003 e os controles não transgênicos (WT). (B) Os eventos E2 e E3 da variedade Vx12-0277 e os controles não transgênicos (WT). A coluna azul representa os níveis de expressão do gene *DDM1* e a coluna laranja do elemento de transposição TE010. Análise estatística ANOVA e teste Tukey.

O evento E7 e E8 da variedade Vx12-1003 tiveram a expressão do gene *DDM1* de 3,9 e 2,6, respectivamente e o controle WT de 1,5. Já a expressão do retrotransposon TE010 foi para os E7 e E8 de 1,6, e o controle não transgênico WT de 1,3 (Figura 20 - A). A avaliação da expressão do gene *DDM1* entre as amostras do evento E2 da variedade Vx12-0277 foi de 19,1, para o evento E3 foi de 43,8, enquanto o controle WT foi de 1,1. A expressão do retrotransposon TE010 para os eventos E2, E3 e controle WT foi próxima de 1,0 (Figura 20 - B). Observa-se que as plantas na casa de vegetação apresentam o mesmo padrão observado nas plantas *in vitro*, entretanto, com marcante expressão do gene *DDM1* e reduzida expressão do retrotransposon TE010, enquanto nas plantas controle não transgênicas (WT) estes genes também apresentaram expressão semelhantes entre eles.

O resultado que se esperava dessa análise de expressão, era que as plantas não transgênicas (WT) das variedades Vx12-1003 e Vx12-0277 tivessem apresentado alta expressão para o elemento de transposição TE010 em relação aos eventos transformados. No entanto, o resultado de expressão observado nos calos foi o mesmo que nas plantas da casa de vegetação, onde o aumento da expressão do gene *DDM1* reduz a expressão do retrotransposon TE010. Observou-se também, que os eventos E3 e E2 da variedade Vx12-0277 foram os que apresentaram os níveis mais elevados da expressão do gene *DDM1* demonstrando a diferença entre os diferentes genótipos.

5.6. Avaliação da metilação do elemento de transposição TE010

Para verificar se o gene *DDM1* realmente está relacionado com a metilação do DNA na cana-energia, foi avaliado a ocorrência de metilação no elemento de transposição TE010 nas plantas transformadas com o *DDM1* e nas plantas controle não transformadas. Após a extração e tratamento com bissulfito, do DNA nas fases R₀, dos eventos E7 e E8 da variedade Vx12-1003 e dos eventos E2 e E3 da variedade Vx12-0277, os produtos de PCR dessas amostras foram sequenciados. No total foram analisadas três repetições para cada evento transgênico e para as plantas não transformadas (E7, E8, E2, E3, WT-1003 e WT-0277). A região do elemento de transposição analisada se refere como Ilha 2 e, foi o local utilizado para o iniciador *Forward*. A Ilha 1 não foi possível ser analisada, pois na avaliação dos iniciadores por PCR surgiram bandas inespecíficas, diante disso para garantir que não haveria dúvidas referente aos resultados que seriam obtidos no sequenciamento, essa análise foi descartada desse trabalho, havendo a necessidade de desenhar novos iniciadores para dar continuidade.

As seqüências do DNA tratados com bissulfito das variedades Vx12-1003 e Vx12-0277 foram alinhadas com a seqüência de referência do retrotransposon TE010. O software BISMA identificou na seqüência referência do retrotransposon 31 regiões CpG, os eventos transformados e as plantas não transgênicas (WT) apresentaram metilação praticamente nas mesmas regiões. Na Figura 21 pode ser observado em cada coluna as regiões CpG, as citosinas metiladas (vermelho) e não metiladas (azul).

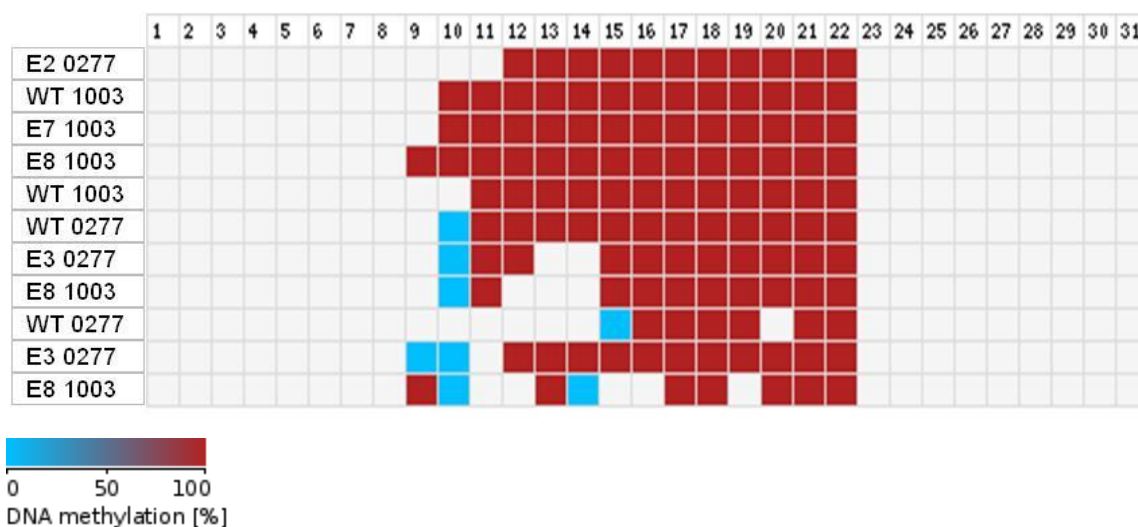


Figura 21. Visão geral condensada do padrão de metilação observado. Do número 1 a 31 representam as regiões CpG na seqüência de referência utilizada do elemento de transposição TE010. As seqüências dos eventos das variedades Vx12-0277 e Vx12-1003 e das plantas controle não transgênicas (wt) são alinhadas com a seqüência do TE010 e comparadas se houve ou não metilação nas regiões CpG, regiões em vermelho representam 100% de metilação, regiões em azul 0% de metilação e regiões em branco são desconhecidas.

Na Tabela 11 está apresentada a média de metilação da variedade Vx12-1003, o evento E7 e o controle não transformado (wt) apresentaram a mesma média de metilação de 100%, já o evento E8 apresentou uma média de metilação inferior ao controle, sendo de 89,26%, por as amostras transformadas resultarem em um nível de metilação igual e inferior ao controle, isso indica que o gene *DDM1* não influenciou na metilação do elemento de transposição TE010 nas amostras transgênicas. Para a variedade Vx12-0277, no entanto observou-se que houve diferença na média de metilação, o controle não transformado (wt) apresentou um nível de metilação do TE010 inferior comparado aos eventos transformados E2 e E3, indicando que a presença do gene *DDM1* pode ter influenciado a metilação dessas

sequências de DNA, essa hipótese também é sugerida devido a expressão por RT-qPCR do gene *DDM1* ter sido significativa nos eventos E2 e E3.

Tabela 11. Nível de metilação em porcentagem de cada sequência analisada da Vx12-0277 e Vx12-1003.

Sequência identificada	Média %
E8 1003	89.26
E7 1003	100.0
WT 1003	100.0
E2 0277	92.3
E3 0277	100.0
WT 0277	89.0

Não foi possível fazer a estatística, pois era necessário pelo menos três análises para cada evento e algumas amostras não apresentaram resultado de sequenciamento confiável e as sequências não continham o número mínimo de nucleotídeos para serem analisados pelo software BISMA, por isso somente a média foi calculada entre cada sequência identificada (Tabela 11). O software calcula uma média em porcentagem entre as amostras analisadas somente das regiões metiladas e não metiladas, conforme demonstrado na Figura 21.

6. DISCUSSÃO

6.1. Desenvolvimento, oxidação e regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos de cana-energia

Das seis variedades avaliadas Vx12-1003, Vx12-0277, Vx12-1022, Vx12-1191, Vx12-1744 e Vx12-1658 os resultados tanto para o nível de oxidação como para o desenvolvimento de calos embriogênicos não apresentaram diferença significativa entre as variedades de cana-energia para produção de calos embriogênicos utilizando o meio de cultura MS3K. Os explantes em cultura de tecidos foram mantidos por um período de 90 a 100 dias, houve formação de calos que apresentaram as mesmas características nos subcultivos já descritos em outras pesquisas, sendo compacto (composto de nódulos duros), friável e estrutura amorfa (Basnayake, et al., 2011). Já os calos não embriogênicos tem aspecto mucilaginoso e apresentam coloração acastanhada devido a oxidação, em contraste, o calo embriogênico tem aspecto granular e coloração entre branco e amarelo claro (Passamani, 2018), deste modo foi possível classificar o desenvolvimento de calos para cada variedade, apesar da resposta morfogênica poder ser influenciada pelo genótipo (Joyce, et al., 2010). Os resultados apresentaram que todas as variedades de cana-energia estudadas: Vx12-1003, Vx12-0277, Vx12-1022, Vx12-1191, Vx12-1744 e Vx12-1658, produziram calos com características embriogênicas.

A oxidação dos calos de cana-energia no decorrer dos subcultivos pode ser influenciada pela qualidade do explante introduzido na cultura de tecidos e também pelos reagentes utilizados no meio MS3K. Estudos que analisaram vários meios de cultura para produção de calos embriogênicos em cana-de-açúcar, descreveram que o processo oxidativo dos calos pode ser causada pela presença de componentes como cobre, zinco e ferro no meio de cultura (Utino, et al., 2001), e também pela liberação de composto fenólicos e polifenólicos (George, et al., 1984). Compostos fenólicos foram observados no explantes de cana-de-açúcar obtidos em época de estiagem, além da produção de calos embriogênicos terem sido inferior comparado aos explantes que foram coletados após o período de chuva, demonstrando que pode ocorrer uma influência sazonal na indução de calos embriogênicos (Basnayake, et al., 2011). Como a coleta de cana-energia para inoculação foi realizada em diferentes épocas do ano, períodos de estiagem pode ter influenciado na oxidação dos calos.

Mesmo com a ocorrência de oxidação nos calos em desenvolvimento, isso não se tornou um fator crucial para a geração de calos embriogênicos entre as variedades de cana-energia. Os resultados demonstraram que é possível utilizar o meio de cultura MS3K para produzir calos embriogênicos para as seis variedades em estudo de cana-energia Vx12-1003, Vx12-0277, Vx12-1022, Vx12-1191, Vx12-1744 e Vx12-1658 e resultaram em material vegetal suficiente para experimentos de transformação genética. Estudos afirmam que a embriogênese somática é a técnica mais eficaz de obtenção de plantas derivadas de transformação por biolística e via *Agrobacterium* (Ithape, et al., 2017).

A regeneração de plantas referente as variedades estudadas, pode ser observada no período de 30 dias no meio de cultura MRP apresentando formação de radícula e dos primórdios foliares, dados semelhantes foram observados por Garcia, et al. (2007) que obtiveram o mesmo resultado com calos embriogênicos. Outros estudos em que suplementaram o meio de cultura com BAP relataram taxas de indução de brotos de 70 a 80% a partir de calos embriogênicos (Diabax, et al., 20011; Singh, et al., 2008). As variedades Vx12-1744 e Vx12-1191 apresentaram elevada taxa de regeneração de 83% e 90%, respectivamente. Em contraste as variedades com menor taxa de regeneração resultaram em 36% para a Vx12-1658 e 46% para a Vx12-1022, essa diferença de regeneração de plantas

também foi observada por Basnayake, et al. (2011) afirmando que a regeneração de plantas varia com o tipo de explante, as condições de cultivo e o genótipo de cana-de-açúcar. Outro fator observado nesse estudo é o tempo de subcultivo do calo embriogênico, calos com 90 a 100 dias que corresponde até a fase R₃ quando são transferidos para o subcultivo R₄, neste período, obteve-se maior eficiência na regeneração de plantas, resultados semelhantes também foram relatados por Nogueira, et al. (2019).

6.2. Transformação genética de calos embriogênicos e regeneração de plantas

Neste trabalho, o método de transformação genética por biolística apresentou baixa eficiência de transformação com o gene *DDM1* co-transformado com o gene de seleção neo. Apesar de terem sido obtidos 3 e 4 eventos com as variedades Vx12-1003 e Vx12-0277, respectivamente. A baixa eficiência também é observada em estudos relatando que foram testados tamanhos diferentes de partículas de ouro e explantes oriundos de embriogênese somática direta e indireta, as transformações resultaram em baixo nível de transformação (Taparia, et al., 2012). Entretanto, outros trabalhos relatam alta eficiência de transformação genética por biolística, sendo considerado por muitos pesquisadores o principal método de transformação de cana-de-açúcar (Bower, et al., 1996). Foi relatado por Ramasamy, et al. (2018) uma eficiência de transformação em cana-de-açúcar de 39% e em cana-energia de 13%. Essa inconsistência de resultados é um fato comum na cana-de-açúcar, que impede o alto rendimento de obtenção de plantas transgênicas (Hotta, et al., 2010).

A dificuldade de se obter alta eficiência de transformação pode ser influenciada devido cana-de-açúcar ser híbridos interespecíficos poliplóides e aneuplóides (Souza, et al., 2019), já foi constatado nas plantas poliplóides mudanças em diversos níveis do genoma, como ação de transposons, duplicação e silenciamento gênico, mudanças cromossômicas intergenômicas, estabilização citonuclear (Wendel, 2000). A complexidade do genoma pode afetar potencialmente o nível de expressão dos genes (Soltis, et al., 2015), essa instabilidade cromossômica que ocorre imediatamente após a duplicação do genoma foi observada em *Brassica napus* (Mestiri, et al., 2010).

Com relação a transformação genética via *Agrobacterium* com o gene *AtBI-1* utilizando calos embriogênicos das variedades Vx12-1744 e Vx12-0277, só se obteve plantas transgênicas com a variedade Vx12-1744. Na variedade Vx12-0277 nenhum calo transformado regenerou plântula, os calos ficavam amarelados e em alguns casos a *Agrobacterium* tomava toda a superfície do calo, essa dificuldade em transformar a Vx12-0277 pode ser por influência do genótipo ou da interação com a linhagem escolhida de agrobactéria (EAH105). Esse resultado também foi observado em outro estudo, onde os autores avaliaram a eficiência de transformação via *Agrobacterium* de diferentes variedades de cana-de-açúcar, e afirmaram que o genótipo também pode interferir no resultado da transformação (Joyce, et al., 2010).

Neste trabalho um dos pontos que diferiu a transformação por biolística da via *Agrobacterium*, foi que os calos embriogênicos transformados por biolística foram co-transformados com o gene *neo*. Já na transformação via *Agrobacterium*, não houve pressão de seleção para obtenção das plantas apesar da construção do vetor possuir o gene *EPSPS* que confere tolerância ao herbicida glifosato, mas este não foi utilizado para selecionar as plantas. Há relatos que isto pode ser uma desvantagem, por não usar um gene marcador selecionável em cultura de tecidos resultando em baixa frequência de transformação, e esse método se torna ineficiente, pois as células transformadas perdem a vantagem de se regenerarem em meio de cultura seletivo, já que a quantidade de células não transformadas é bem maior e dificultaria muito a identificação das plantas transgênicas (Elliott, et al., 1998). No entanto, mesmo sem o

gene de seleção foi obtido maior eficiência de transformação utilizando o método via *Agrobacterium* totalizando 22 eventos da variedade Vx12-1744, em comparação com a transformação por biolística que resultou somente em 7 eventos totais. As vantagens de se transformar via *Agrobacterium* é na capacidade de transferir longos trechos de DNA com baixo número de cópias, mínimo de rearranjos no genoma nas plantas transformadas, além da técnica ser mais simples quanto comparada ao método de biolística (Manickavasagam, et al., 2004).

Uma sugestão para aumentar a eficiência de transformação via *Agrobacterium* seria fazer uma nova construção do vetor contendo um gene marcador seletivo como por exemplo, o gene neo, o qual já que apresentou ser um marcador de seleção eficiente em calos embriogênicos de cana-de-açúcar transformados por *Agrobacterium*, além da proteína neomicina fosfotransferase não ser tóxica para seres humanos (Fuchs, et al., 1993; Zhangsun, et al., 2007). Entretanto, há vários fatores que interferem na eficiência de transformação via *Agrobacterium*, como a construção gênica, o tempo em que os calos permanecem no co-cultivo e a composição utilizada no meio de cultura além do tipo de cepa de *Agrobacterium*. Enfim, todos esses aspectos influenciam na regeneração de plantas e na expressão do gene (Joyce, et al., 2010) adicionados aos fatores da espécie receptora, pois as cultivares comerciais de cana-de-açúcar geralmente são híbridos aneuploides interespecíficos complexos, cujas características influenciam na eficiência da transformação (Manickavasagam, et al., 2004; Mayavan, et al., 2015).

Ainda que nesse trabalho houve baixa eficiência de transformação, foi possível obter plantas transformadas utilizando os dois métodos, por biolística e *Agrobacterium*, indicando que a cana-energia é uma cultivar responsiva para os métodos de transformação abordados. Estudos e testes futuros em relação a todos os pontos críticos discutidos acima serão importantes para aumentar a eficiência de transformação da cana-energia.

6.3. Expressão do gene *DDM1* visando estabilidade de transgene

Os resultados obtidos nas análises de expressão do gene *DDM1* e do retrotransposon TE010, tanto na cultura de tecidos, como em plantas mantidas na casa de vegetação por 10 meses, foram semelhantes. Foi observado diferenças na expressão do gene *DDM1* entre nos eventos transgênicos obtidos das variedades Vx12-1003 e Vx12-0277. Os resultados foram consistentes nos eventos da variedade Vx12-0277 com significativa alta expressão do gene *DDM1* e baixa expressão do retrotransposon TE010 nas fases R₀, R₁, R₄ e nas plantas crescidas na casa de vegetação. Por outro lado, os eventos obtidos da variedade Vx12-1003 tiveram expressão do gene *DDM1* variadas entre os eventos nas fases R₀, R₁, R₄ e de plantas crescidas na casa de vegetação. Somente os eventos crescidos na casa de vegetação mostraram alta expressão do gene *DDM1* nos dois eventos (E7 e E8). O evento E7 apresentou maior expressão nas fases de desenvolvimento dos calos R₀, R₄ e casa de vegetação, já na fase R₁, a expressão do retrotransposon TE010 foi maior nos eventos e nas plantas controle não transgênica, contrastando com os eventos da variedade Vx12-0277. Os motivos do gene *DDM1* não ter sido expresso nos eventos da variedade Vx12-1003 pode ter sido devido o genótipo ter influenciado a expressão do gene (Choi, et al., 2018). Observa-se que em geral, a faixa do nível de expressão dos eventos da variedade Vx12-1033 varia de 0,2 a 5,9, nos eventos da variedade Vx12-0277 foi 1 a 45. Essas variações podem estar relacionadas à região de inserção do transgene no genoma, ao número de cópias inseridos e a integridade do transgene após a inserção (Picelli, 2010; Hotta et al., 2010). Apesar da diferença de expressão do gene *DDM1* entre os genótipos nas fases de desenvolvimento dos calos, é consistente a observação que alta expressão deste gene, diminui a expressão do retrotransposon TE010 estudada. Este resultado confirma a função do gene *DDM1* é necessária para suprimir os retrotransposon conforme apresentado por Hirochika et al., 2000 e Lippman et al., 2004.

Com relação à análise de expressão do TE010, na cultura de tecidos era esperado que os calos não transformados (WT) das variedades Vx12-1003 e Vx12-0277 apresentassem maior nível de expressão em comparação com os calos provenientes dos eventos transformados, porém isso não ocorreu, pois não houve diferença no nível de expressão entre eles. Em um estudo utilizando a espécie *Brassica napus*, foi demonstrado que quando a taxa de indução de calo foi alta, o nível de metilação do DNA foi menor (Gao, et al., 2014). Entretanto, a indução de calos embriogênicos para as variedades Vx12-1003 e Vx12-0277 apresentaram resultados semelhantes, sendo a média de 3,5 calos por disco foliar, que pode indicar os resultados obtidos.

Estudos apontam que plantas em situações de estresse ambiental como biótico e abiótico, a estrutura da cromatina pode ser alterada, o que está associado com a metilação de DNA e modificação de histonas, essas mudanças ambientais podem influenciar na ativação de elementos de transposição (Grandbastien 2004; Lisch, D, 2013). Diante destas informações, para confirmar se a expressão do elemento de transposição TE010 não foi significativamente diferente nos calos não transformados das variedades Vx12-1003 e Vx12-0277 comparando com os calos transformados devido ao ambiente controlado do cultivo *in vitro*, também foram coletadas amostras no período mais quente do dia de cana-energia transformadas com o gene *DDM1* cultivadas em casa de vegetação. No entanto, a análise de RT-qPCR dessas plantas apresentou resultados semelhantes aos resultados obtidos com calos embriogênicos, a expressão do retrotransposon TE010 não apresentou diferença estatística significativa em relação aos eventos transformados com o gene *DDM1*.

Em um estudo realizado por Picelli (2010) foi avaliado a expressão de elemento de transposição TE010 e do gene *DDM1* em cana-de-açúcar (RB835486) utilizando a técnica RT-PCR. No trabalho, o autor demonstrou que o retrotransposon TE010 apresentou elevado nível de expressão nos subcultivos R₀ a R₄ e nas plantas transgênicas com o gene *DDM1*, o nível de expressão variou entre os eventos, mas demonstraram que quando havia alta expressão do gene *DDM1*, a expressão do retrotransposon TE010 era menor. Os fatores que podem ter influenciado nos resultados dos dois trabalhos são: o período de subcultivo dos calos na cultura de tecidos, que varia de 3 meses a 6 meses; as técnicas utilizadas para de análise de expressão, RT-qPCR e RT-PCR; os genótipos em estudo, cana-energia e cana-de-açúcar.

Sugere-se que sejam feitas mais análises de expressão de outros elementos de transposição, principalmente os ETs das famílias *Hopscotch* e *Mutator*, já que mais de 50% dos elementos de transposição pertencem a elas (de Araujo, et al., 2005). Também haveria a necessidade de avaliar mais plantas transgênicas, pois o local de inserção do gene pode apresentar maior ou menor expressão do mesmo. Outra análise que deveria ser feita é avaliar quantas cópias do gene *DDM1* foram inseridas no genoma, pois a transformação por biolística insere várias cópias do gene transformante no genoma podendo silenciar o transgene (Daíet al., 2001).

6.4. Metilação do elemento de transposição TE010

O resultado de metilação fornecido pelo software BISMA, indica que possivelmente o gene *DDM1* estaria influenciando a metilação do retrotransposon TE010 nos eventos E2 e E3 da variedade Vx12-0277. Esse resultado está de acordo com o resultado obtido através da análise RT-qPCR, em que o gene *DDM1* está sendo significativamente mais expresso nesses eventos quando comparado com as variedades não transformadas. Em consequência, através da análise do DNA tratado com bisulfito dos calos na fase R₀ da Vx12-0277, verificou-se que os eventos E2 e E3 apresentaram média de metilação maior comparada com a metilação ocorrida nos calos não transformados.

Já com relação a variedade Vx12-1003, uma possibilidade, é que os resultados tenham sido similares entre os calos embriogênicos transformados e os calos não transformados, por uma possível disfunção das metiltransferases de DNA MET1 (*Methyltransferase 1*) e CMT3 (*Chromomethylase 3*) e a disfunção do *DDM1* resultam em elevados níveis de transposição e forte hipometilação de DNA nas regiões CG e CHG (Kato, et al., 2003; Tsukahara, et al., 2009), já que o gene *DDM1* não apresentou expressão significativa na análise de RT-qPCR.

A variação da metilação entre as variedades VX12-0277 e Vx12-1003 pode ser devido a metilação da citosina variar durante o desenvolvimento do tecido, na diferenciação celular e nos estágios de desenvolvimento de cada espécie de planta (Xu, et al., 2004, Valledor, et al., 2006; Meilinger, et al., 2009). Outro fator pode ser devido que em transposons longos a metilação nas regiões CHH (H representa A, T ou C) sejam dependentes de *DDM1* e catalisada por CMT2 (*Chromomethylase 2*) (Stroud, et al. 2014; Zemach, et al. 2013).

Uma hipótese do gene *DDM1* ter tido expressão significativa somente na fase de subcultivo R₀, pode estar relacionado com a atividade dos elementos de transposição nessa fase de diferenciação das células, pois haveria maior atividade de elementos de transposição. Os retrotransposons LTR mais antigos tem níveis de metilação inferior comparados aos retrotransposons LTR mais jovens onde os níveis de metilação são mais elevados (Von Hold, et al., 2012), onde o período de subcultivo pode estar influenciando, já que o tempo de desenvolvimento na cultura de tecidos pode afetar o nível de metilação em calos e plantas regeneradas (Li et al. 2011).

7. CONCLUSÃO

Todas as variedades de cana-energia apresentaram resultados positivos na formação de calos embriogênicos, sendo que a variedade Vx12-1744 apresenta melhor potencial de obtenção de calos embriogênicos com média de 3,8 calos por explante e redução do nível de oxidação durante os subcultivos.

O tempo ideal de subcultivo de calos embriogênicos das variedades de cana-energia é de 90 a 100 dias, que corresponde entre a fase R₃ e R₄, esse é o período ideal tanto para transformar os calos por biolística e via *Agrobacterium*, favorecendo a eficiência da regeneração de plantas.

É possível transformar geneticamente calos embriogênicos das variedades de cana-energia Vx12-1003 e Vx12-0277 utilizando o método de biolística através da co-transformação com os genes *DDM1* e *neo*, mas ainda é necessário fazer alterações nas metodologias para se obter maior eficiência de transformação.

A transformação genética da variedade Vx12-1744 via *Agrobacterium* utilizando o gene *AtBI-1* apresentou maior eficiência na obtenção de plantas transformadas correspondendo a 22 eventos.

A expressão do gene *DDM1* entre as variedades cana-energia Vx12-1003 e Vx12-0277 podem ter sido diferentes devido à influência do genótipo e demonstrou correlação deste gene no controle da expressão do retrotransposon TE010.

O gene *DDM1* influenciou na metilação do retrotransposon TE010 na fase de subcultivo R₀ nos eventos E2 e E3 da variedade Vx12-0277, silenciando a atividade deste elemento de transposição.

REFERÊNCIAS

- Alves, S. C.; Worland, B.; Thole, V.; Snape, J. W.; Bevan, M. W.; Vain, P. A protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brachypodium distachyon* community standard line Bd21. *Nature Protocols*, v. 4, Nº5, p.638-648, 2009.
- Araujo, P.G., Rossi, M., de Jesus, E.M., Saccaro, N.L., Kajihara, D., Massa, R., et al. Transcriptionally active transposable elements in recent hybrid sugarcane. *Plant J.* 44: 707–717. 2005.
- Arruda, P. Genetically modified sugarcane for bioenergy generation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23 (3), 315–322. 2012.
- Basnayke, S. W. V.; Moyle, R.; Birch, R. G. Embryogenic callus proliferation and regeneration conditions or genetic transformation of diverse sugar cultivars. *Plant Cell Reports*, v. 30, p. 439-448, 2011.
- Baek D, Nam J, Koo YD, Kim DH, Lee J, Jeong JC, Kwak SS, Chung WS, Lim CO, Bahk JD, Hong JC, Lee SY, Kawai-Yamada M, Uchimiya H, Yun DJ. Bax-induced cell death of Arabidopsis is mediated through reactive oxygen-dependent and -independent processes. *Plant Mol Biol* 56: 15–27. 2004.
- Bennetzen, J.L. Transposable element contributions to plant genome evolution. *Plant Mol. Biol.* 42, 251–269. 2000.
- Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory, *Genes Dev.*, vol. 16, pp. 6–21. 2002.
- Bower, R.; Elliott, A. R.; Potier, B. A. M.; Birch, R. G. High-efficiency, microprojectile-mediated cotransformation of sugarcane, using visible or selectable markers. *Mol Breed* 2:239–249. 1996.
- Butterfield, M.K.; Irvine, J.E.; Garza, M.V.; Mirkov, T.E. Inheritance and segregation of virus and herbicide resistance transgenes in sugarcane. *Theoretical and Applied Genetics*, New York, v. 104, p. 797–803, 2002.
- Carvalho-Netto, O. V.; Bressiani, J. A.; Soriano, H. L.; Fiori, C. S.; Santos, J. M.; Barbosa, G. VS.; Xavier, M. A.; Landell, M. GA.; Pereira, G. AG. The potential of the energy cane as the main biomass crop for the cellulosic industry. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, v. 20. 2014.
- Chae, Han-Jung, Hyung-Ryong Kim, Chunyan Xu, Beatrice Bailly-Maitre, Maryla Krajewska, Stan Krajewski, Steven Banares, Janice Cui, Murat Digicaylioglu, Ning Ke, Shinichi Kitada, Edward Monosov, Michael Thomas, Christina L Kress, Jeremy R Babendure, Roger Y Tsien, Stuart A Lipton, John C Reed. BI-1 Regulates an Apoptosis Pathway Linked to Endoplasmic Reticulum Stress, *Molecular Cell*, V. 15, Issue 3, p. 355-366. 2004.
- Choi, J. Y., Purugganan, M. D. Evolutionary Epigenomics of Retrotransposon-Mediated Methylation Spreading in Rice. *Molecular Biology and Evolution*, Volume 35, Issue 2, Pages 365–382, 2018.

- Conab - Companhia Nacional de Abastecimento. <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/2859-producao-de-etanol-no-brasil-mantem-recorde-e-alcanca-33-58-bilhoes-de-litros>. Acessado em 2020.
- Dai, S. H.; Zheng, P.; Marmey, P.; Zhang, S. P.; Tian, W. Z.; Chen, S.Y.; Beachy, R. N.; Fauquet, C. Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. *Mol Breed* 7:25–33. 2001.
- Danial, N.N. and Korsmeyer, S. Cell death: critical control points. *Cell*, 116, 205–219. 2004.
- Dibax R, Alcantara GB, Machado MP, Bespalhok Filho JC, Oliveira R. A..Plant regeneration of sugarcane cv. RB931003 and RB98710from somatic embryos and acclimatization. *J Biotechnol Biodivers*. 2:32–37. 2011.
- Doyle, J. J.; Doyle, L. J.A rapid isolation from small quantities of fresh leaf tissue.*Phytochemical Bulletin*, v.19, p. 11-15, 1987.
- El Bassam, N. Energy plant species. Science Publishers Ltd., London. James & James (Science Publishers) Ltd., ©1998.
- Elliott AR, Campbell JA, Brettell RIS, Grof CPL. *Agrobacterium*-mediated transformation of sugarcane using GFP as a screenable marker. *Aust J Plant Physiol* 25:739–743. 1998.
- Feschotte, C., Jiang, N. and Wessler, S.R. Plant transposable elements: where genetics meets genomics. *Nat. Genet*. 3, 329–341. 2002.
- Foyouzi-Youssefi R, Arnaudeau S, Borner C, Kelley WL, Tschopp J, Lew DP, Demareux N, Krause KH. Bcl-2 decreases the free Ca²⁺ concentration within the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 5723–5728. 2000.
- Frommer, M., McDonald, L. E., Millar, D. S., Collis, C. M., Watt, F., Grigg, G. W., Molloy, P. L., and Paul, C. L. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 1827-1831. 1992.
- Fuchs RL, Ream JE, Hammond BG, Naylor MW, Leimgruber RM, Berberich SA. Safety assessment of the neomycin phosphotransferase II (NPTII) protein. *Biotechnology* 11:1543–1547. 1993.
- Gao, Y., Ran, L., Kong, Y. *et al.* Assessment of DNA methylation changes in tissue culture of *Brassica napus*. *Russ J Genet* 50, p. 1186–1191. 2014.
- Garcia R, Cidade D, Castellar A, Lips A, Magioli C, Callado C, Mansur E. *In vitro* morphogenesis patterns from shoot apices of sugarcane are determined by light and type of growth regulator. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 90:181–190. 2007.

- George, E. F.; Sherrington, P. D. *Plant propagation by tissue culture*. Inglaterra, Hants: Exegetics Limited, 1984. 709p. 1984.
- Goldemberg, J. The Brazil biofuel industry. *Biotechnol Biofuels* 1:1–6. 2008.
- Goldemberg, J. Coelho S. T.; Guardabassi P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. *Energy Policy* 36:2086–2097. 2008.
- Gonzales-Hernandez JL, Sarath G, Stein JM, Owens V, Gedye K, Boe A. A multiple species approach to biomass production from native herbaceous perennial feedstocks. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 45:267–28, 1. 2009.
- Grandbastien, M.A. Stress activation and genomic impact of plant retrotransposons. *J. Soc. Biol.* 198: 425–432. 2004.
- Grivet, L., Arruda, P. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. *Current Opin Plant Biol*, 5:122-127. 2001.
- Hill J, Nelson E, Tilman D, Polasky S, Tiffany D. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proc Natl Acad Sci* 103(Suppl 43):11206–11210. 2006.
- Hotta, C. T.; Lembke, C. G.; Domingues, D. S.; Ochoa, E. A.; Cruz, G. M.; Melotto-Passarim, D. M.; Marconi, T. G.; Santos, M. O.; Mollinari, M.; Margarido, G. R. The biotechnology roadmap for sugarcane improvement. *Trop. Plant Biol.*, 3 (2), 75–87. 2010.
- Ihara-Ohori, Y., Minoru Nagano, Shoshi Muto, Hirofumi Uchimiya, Maki Kawai-Yamada. Cell Death Suppressor Arabidopsis Bax Inhibitor-1 Is Associated with Calmodulin Binding and Ion Homeostasis. *Plant Physiology*, 143 (2) 650-660. 2007.
- Iskandar, H. M.; Casu, R.; Maclean, D. J.; Simpson, R. S.; Bonnett, G.; Manners, J. M. Comparison of Reference Genes for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Analysis of Gene Expression in Sugarcane. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 22, n. 4, p. 325-337, 2004.
- Isbat, M., Zeba, N., Kim, S.R. and Hong, C.B. A BAX inhibitor-1 gene in *Capsicum annuum* is induced under various abiotic stresses and endows multi-tolerance in transgenic tobacco. *J. Plant Physiol.* 166, 1685–1693. 2009.
- Ithape, D. M.; Maharana, M.; Tripathy, S. K. Scope of Genetic Transformation in Sugarcane: A Review. *Genomics and Applied Biology*, v. 8 (1), p. 1–7. 2017.
- Jain, S. M. Tissue cultured-derived variation in crop improvement. *Euphytica*, Dordrecht, v. 118, p. 153-166, 2001.

- JASP Team (Version 0.12.0). [Computer software]. Retrieved from. 2019. <https://jasp-stats.org/>
- Jeddeloh JA, Bender J, Richards EJ. The DNA methylation locus DDM1 is required for maintenance of gene silencing in *Arabidopsis*. *Genes Dev*; 12: 1714–1725. 1998.
- Long, J. C., Xia, A. A., Liu, J. H., Jing, J. L., Wang, Y.Z., Qi, C. Y., He, Y. Decrease in DNA methylation 1 (DDM1) is required for the formation of mCHH islands in maize^{FA}. *Journal of Integrative Plant Biology*, v. 61, p. 749-764, nov. 2018.
- Johnson J. M. F, Coleman M .D, Gesh R, Jaradat A, Mitchell R, Reicosky D, Wilhelm W. W. Biomass-bioenergy crops in the United States: a changing paradigm. *Am J Plant Sci Biotechnol* 1(Suppl 1): p. 1–28. 2007.
- Joyce, P.; Kuwahata, M.; Turner, N.; Lakshamanan, P. Selection system and cocultivation medium are important determinants of *Agrobacterium*-mediated transformation of sugarcane. *Plant Cellular Reports*, Berlin, v. 29, n. 2, p. 173-183, 2010.
- Kaeppler, S.M., Kaeppler, H.F., Rhee, Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Mol. Biol.* 43: 179–188. 2000.
- Kato, M., Miura, A., Bender, J., Jacobsen, S. E. & Kakutani, T. Role of CG and non- CG methylation in immobilization of transposons in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 13, 421–426, 2003.
- Kawai-Yamada M, Ohori Y, Uchimiya H. Dissection of Arabidopsis Bax Inhibitor-1 suppressing Bax-, hydrogen peroxide-, and salicylic acid-induced cell death. *Plant Cell* 16: 21–32. 2004.
- Kim, M.; Day, D. F. Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 38, p. 803–807. 2011.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, and Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549,2018.
- Lakshmanan, P., Geijskes, R.J., Wang, L. *et al.* Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids) leaf culture. *Plant Cell Rep* v. 25, p. 1007–1015. 2006.
- Lam, E. Controlled cell death, plant survival and development. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, v. 5, p. 305–315. 2004.
- Li, L. C.; Dahiya, R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*.18(11):1427-31. 2002.

- Li, W., Liu, H., Cheng, Z.J., Su, Y.H., Han, H.N., Zhang, Y., Zhang, X. S. DNA methylation and histone modifications regulate de novo shoot regeneration in Arabidopsis by modulating WUSCHEL expression and auxin signaling. *PLoS Genet.* 7. 2011.
- Lippman Z, Gendrel AV, Black M, Vaughn MW, Dedhia N, McCombie WR, Lavine K, Mittal V, May B, Kasschau KD, Carrington JC, Doerge RW, Colot V, Martienssen R. Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature*; 430: 471–476. 2004.
- Lisch, Damon. "How important are transposons for plant evolution?" *Nature Reviews Genetics*, vol. 14, no. 1, p. 49. 2013.
- Livak, K. J, Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta Ct$ Method. *Methods.* 25(4):402-408, 2001.
- Loureiro, M.E., Barbosa, M. H. P., Lopes, F. J. F., Silvério, F. O. Sugarcane breeding and selection for more efficient biomass conversion in cellulosic ethanol. In: Buckeridge MS, Goldman GH (eds) Routes to cellulosic ethanol. Springer, New York, p. 199–239. 2011.
- Manickavasagam, M., Ganapathi, A., Anbazhagan, V.R. et al. Agrobacterium-mediated genetic transformation and development of herbicide-resistant sugarcane (Saccharum species hybrids) using axillary buds. *Plant Cell Rep*23,134–143. 2004.
- Masuta, Y., Kosuke Nozawa, Hiroki Takagi, Hiroki Yaegashi, Keisuke Tanaka, Tasuku Ito, Hideyuki Saito, Hisato Kobayashi, Wataru Matsunaga, Seiji Masuda, Atsushi Kato, Hidetaka Ito, Inducible Transposition of a Heat-Activated Retrotransposon in Tissue Culture, *Plant and Cell Physiology*, Volume 58, Issue 2, Pages 375–384. February 2017.
- Matsuoka, S., Kennedy, A. J., Santos, E. G. D. D., Tomazela, A. L., & Rubio, L. C. S. Energy cane: its concept, development, characteristics, and prospects. *Advances in Botany*, 2014.
- Mayavan S, Subramanyam K, Jaganath B, Sathish D, Manickavasagam M, Ganapathi A. Agrobacterium-mediated in planta genetic transformation of sugarcane setts. *Plant Cell Reports.* 34(10):1835-1848. 2015.
- Meilinger, D., Fellingner, K., and Bultmann, S., Np95 interacts with *de novo* DNA methyltransferases, Dnmt3a and Dnmt3b, and mediates epigenetic silencing of the viral CMV promoter in embryonic stem cells, *EMBO Rep.*, vol. 10, pp. 1259–1264.2009.
- Melotto-Passarin, D. M. **Transformação genética de cana-de-açúcar por biolística e Agrobacterium tumefaciens visando estudar o mecanismo de morte celular programada.** 2009. 147 p. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

- Mestiri I, Chague´ V, Tanguy A. M, Huneau C, Huteau V, Belcram H, Coriton O, Chalhoub B, Jahier J. Newly synthesized wheat allohexaploids display progenitor-dependent meiotic stability and aneuploidy but structural genomic additivity. *New Phytol*, 186:86-101. 2010.
- Murashige, T.; Skoog, F. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Kobenhavn, v. 15, n. 3, p. 473-479, 1962.
- Negrotto, D.; Jolley, M.; Beer, S.; Wenck, A. R.; Hansen, G. The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium transformation*. *Plant Cell Rep* v. 19, p. 798–803, 2000.
- Nogueira, G.F., Luis, Z.G., Pasqual, M. et al. High-efficiency somatic embryogenesis of a broad range of Brazilian *Saccharum* spp. hybrids (sugarcane) varieties using explants from previously established in vitro plants. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 55, 26–35. 2019.
- Passamani, L. Z.; Bertolazi, A. A.; Ramos, A. C.; Santa-Catarina, C.; Thelen, J. J.; Silveira, V. Embryogenic Competence Acquisition in Sugar Cane Callus Is Associated with Differential H⁺-Pump Abundance and Activity. *Journal of Proteome Research*: 17 (8), 2767-2779, 2018.
- Picelli, E. C. M. **Cultura de tecidos e transformação genética com o gene Ddm1 no estudo do silenciamento de elementos de transposição.** 2010. 140 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.
- Piperidis, G.; Piperidis, N.; D’Hont, A. Molecular cytogenetic investigation of chromosome composition and transmission in sugarcane. *Mol Genet Genomics*, 284:65–73. 2010.
- Planckaert, F. and Walbot, V. Molecular and genetic characterization of mu-transposable elements in *Zea mays*—behavior in callus culture and regenerated plants. *Genetics*, v. 123, p. 567–578. 1989.
- Ramasamy, M.; Mora, V.; Damaj, M. B.; Padilla, C. S.; Ramos, N.; Rossi, D.; Solís-Gracia, N.; Vargas-Bautista, C.; Irigoyen, S.; DaSilva, J. A.; Mirkov, T. E.; Mandadi, K. K. A biolistic-based genetic transformation system applicable to a broad-range of sugarcane and energycane varieties. *GM Crops Food*; 9(4): 211–227. 2018.
- Ramiro, D. A., Danila Montewka Melotto-Passarin, Mariana de Almeida Barbosa, Flavio dos Santos, Sergio Gregorio Perez Gomez, Nelson Sidnei Massola Junior, Eric Lam and Helaine Carrer. Expression of Arabidopsis Bax Inhibitor-1 in transgenic sugarcane confers drought tolerance. *Plant Biotechnology Journal*, v. 14, p. 1826–1837. 2016.
- Rossi, M., Araujo, P. G., Van Sluys, M. Survey of transposable elements in sugarcane expressed sequence tags (ESTs). *Genet. Mol. Biol.*, São Paulo, v. 24, n. 1-4, p. 141-146, Dec. 2001.

- Rohde, C., Zhang, Y., Reinhardt, R. and, Jeltsch, A. BISMA - Fast and accurate bisulfite sequencing data analysis of individual clones from unique and repetitive sequences. *BMC Bioinformatics* 11, 230, 2010.
- Ryan, D.P., and Owen-Hughes, T. Snf2-family proteins: chromatin remodellers for any occasion. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15, 649–656. 2011.
- Sahu, P.P., Pandey, G., Sharma, N., et al., Epigenetic mechanisms of plant stress responses and an adaptation, *Plant Cell Rep.*, vol. 32, pp. 1151–1159. 2013.
- Schmitz RJ, Schultz MD, Lewsey MG, O'Malley RC, Urich MA, Libiger O, Schork NJ, and Ecker JR.. Transgenerational epigenetic instability is a source of novel methylation variants. *Science*,334: 369–373. 2011.
- Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, SorcinelliMD, Pozzan T, Korsmeyer S. J. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca21: a control point for apoptosis. *Science* 300: 135–139. 2003.
- Setta, N., Monteiro-Vitorello, C. B., Metcalfe, C. J., Cruz, G. M. Q., Del Bem, L. E., Vicentini R., Nogueira F. T. S., Campos, R. A., Nunes, S. L., Turrini, P. C. G., Vieira, A. P., Cruz, E. A. O., Corrêa, T. C. S., Hotta, C. T., Varani, A. de M., Vautrin, S., Trindade, A. S. da, Vilela, M. de M., Lembke, C. G., Sato, P. M., Andrade, R. F. de, Nishiyama Junior, M. Y., Cardoso-Silva, C. B., Scortecci, K. C., Garcia, A. A. F., Carneiro, M. S., Kim, C., Paterson, A. H., Bergès, H., D'Hont, A., Souza, A. P. de, Souza, G. M., Vincentz, M., Kitajima, J. P., Van Sluys M-A. Building the sugarcane genome for biotechnology and identifying evolutionary trends. *BMC Genomics*. London, v. 15, p. 17 ,2014.
- Singh G, Sandhu SK, Meeta M, Singh K, Gill R, Gosal S. S. *In vitro* induction and characterization of somaclonal variation for red rot and other agronomic traits in sugarcane. *Euphytica*160:35–47. 2008.
- Soltis, P. S., Marchant, D. B., de Peer, Y. V., Soltis, D. E. Polyploidy and genome evolution in plants, *Current Opinion in Genetics & Development*, Volume 35, Pages 119-125. 2015.
- Souza GM, Berges H, Bocs S, Casu R, D'Hont A, Ferreira JE, Henry R, Ming R, Potier B, Van Sluys M-A, Vincentz, M., Paterson, A. H. The Sugarcane Genome Challenge: Strategies for Sequencing a Highly Complex Genome. *Tropical Plant Biology*, 4:145-156. 2011.
- Souza, G. M., Van Sluys, Marie-Anne, V., Lembke, C. G., Lee, H., Margarido, G. R. A., Hotta, C. T., Gaiarsa, J. W., Diniz, A. L., Oliveira, M. M., Ferreira, S. S., Nishiyama, M. Y., ten-Caten, F. Jr., Ragagnin, T. G., Andrade, P. M., Souza, R. F., Nicastro, G. G., Pandya, R., Kim, C., Guo, H., Durham, A. M., Carneiro, M. S., Zhang, J., Zhang, X., Zhang, Q., Ming, R., Schatz, M. C., Davidson, B., Paterson, A. H., Heckerman, D. Assembly of the 373k gene space of the polyploid sugarcane genome reveals reservoirs of functional diversity in the world's leading biomass crop, *GigaScience*, Volume 8, Issue 12, December 2019.
- Sticklen, M. B. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. *Nat Rev Genet.*; v. 9, p. 433-443. 2008.

- Stroud, H. et al. Non-CG methylation patterns shape the epigenetic landscape in *Arabidopsis*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 64–72. 2014.
- Taparia, Y., Gallo, M. & Altpeter, F. Comparison of direct and indirect embryogenesis protocols, biolistic gene transfer and selection parameters for efficient genetic transformation of sugarcane. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **111**, 131–141. 2012.
- Tew, T.L. and Cobill, R. M. Genetic improvement of Sugarcane (*Saccharum* spp.) as an Energy Crop. In: Vermerris W. (eds) *Genetic improvement of Bioenergy Crops*. Springer, New York, p. 273-294. 2008.
- Tukey, J. W. Comparing individual means in the analysis of variance. *Biometrics*;5(2):99-114. 1945.
- Tsukahara, S.; Akie Kobayashi, A.; Kawabe, A.; Mathieu, O.; Miura, A.; Kakutani, T. Bursts of retrotransposition reproduced in *Arabidopsis*. *Nature* **461**, 423–426, 2009.
- Utino, S.; Carneiro, I. F.; Chaves, L. J. Crescimento e oxidação de explantes de bananeiraprata (*Musa AAB*) in vitro. I. Concentrações de sais de ferro, cobre e zinco. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 225-229, 2001.
- Vain, P.; McMullen, M. D.; Finer, J. J. Osmotic treatment enhances particle bombardment mediated transient and stable transformation of maize. *Plant Cell Reports*, Berlin, v. 12, p. 84-88, 1993.
- Valledor, L., Hasbun, R., and Meijon, M., Involvement of DNA methylation in tree development and micropropagation, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, vol. 91, pp. 75–86. 2006.
- Vongs A, Kakutani T, Martienssen R, Richards E. *Arabidopsis thaliana* DNA methylation mutants. *Science*, v. 260, p. 1926–1928. 1993.
- Von Holdt B. M, Takuno, S, Gaut, B. S. Recent retrotransposon insertions are methylated and phylogenetically clustered in Japonica Rice (*Oryza sativa* spp. *japonica*). *Mol Biol Evol.* **29**(10):3193–3203. 2012.
- Xu, Q. and Reed, J.C. Bax inhibitor-1. A mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. *Mol. Cell*, **1**, 337–346. 1998.
- Xu, M.L., Li, X.Q., and Korban, S.S., DNA_methylation alterations and exchanges during in vitro cellular differentiation in rose (*Rosa hybrida* L.), *Theor. Appl. Genet.*, vol. 109, pp. 899–910. 2004.
- Zhangsun D, Luo S, Chen R, Tang K. Improved *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of GNA transgenic sugarcane. *Biologia* **62**:386–393. 2007.

- Zemach, A. M. Yvonne Kim, Ping-Hung Hsieh, Devin Coleman-Derr, Leor Eshed-Williams, Ka Thao, Stacey L. Harmer, Daniel Zilberman. The Arabidopsis Nucleosome Remodeler DDM1 Allows DNA Methyltransferases to Access H1-Containing Heterochromatin, *Cell*, Volume 153, Issue 1. Pages 193-205. 2013.
- Zhang, H., Lang, Z. & Zhu, J. Dynamics and function of DNA methylation in plants. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 489–506. 2018.
- Zhang, Q., Li, Y., Xu, T. *et al.* The chromatin remodeler DDM1 promotes hybrid vigor by regulating salicylic acid metabolism. *Cell Discovery*, v. **2**, 16027. 2016.
- Wang QM, Wang L. An evolutionary view of plant tissue culture: somaclonal variation and selection. *Plant Cell Rep*;31(9):1535-1547. 2012.
- Watanabe, N. and Lam, E. Arabidopsis Bax inhibitor-1 functions as an attenuator of biotic and abiotic type of cell death. *The Plant Journal*.v. 45, 884–894. 2006.
- Watt, M. P.; Banasiak, M.; Reddy, D.; Albertse, E. H.; Snyman, S. J. In vitro minimal growth storage of *Saccharum* spp. Hybrid (genotype 88H0019) at two stage of direct somatic embryogenic regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 96, p. 263-271, 2009.
- Wendel, J.F. Genome evolution in polyploids. *Plant Molecular Biology*, Dordrecht, v. 42, p. 225-249, 2000.
- Woodard, K. R., Prine, G. M. Dry matter accumulation of elephantgrass energycane and elephantmillet in a subtropical climate. *Crop Science*. , V. 33, p. 818-824. DOI:10.2135. Julho 1993.
- Yang H, Yan R, Chen H, Zheng C, Lee DH and Liang DT In-Depth investigation of biomass pyrolysis based on three major components: hemicellulose, cellulose and lignin. *Energy Fuels*. V. 20, p. 388-393. 2006.
- Yang, M. & Loh, C. S. Systemic endopolyploidy in *Spathoglottis plicata* (Orchidaceae) development. *BioMed Central Cell Biology*, v. 33, n. 5, p. 1-8, 2004.