

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE  
MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**OBTENÇÃO DE PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR  
GENETICAMENTE MODIFICADAS SUPEREXPRESSANDO  
O GENE DIRIGENTE-JACALINA (*ShDJ*)**

**Caroline Fregonesi**  
Tecnóloga em Biotecnologia

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE  
MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**OBTENÇÃO DE PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR  
GENETICAMENTE MODIFICADAS SUPEREXPRESSANDO  
O GENE DIRIGENTE-JACALINA (*ShDJ*)**

**Caroline Fregonesi**

**Orientador: Dr. Dilermando Perecin**

**Coorientadora: Dra. Silvana Aparecida Creste Dias de Souza**

Dissertação apresentada à  
Faculdade de Ciências Agrárias e  
Veterinárias – UNESP, Campus de  
Jaboticabal, como parte das  
exigências para a obtenção do título  
de Mestre em Agronomia (Genética  
e Melhoramento de Plantas).

F859o Fregonesi, Caroline

Obtenção de plantas de Cana-de-açúcar geneticamente modificadas superexpressando o gene Dirigente-Jacalina (ShDJ) / Caroline Fregonesi. - Jaboticabal, 2021

50 p.: il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Dilermando Perecin

Coorientadora: Silvana Aparecida Creste Dias de Souza

1. Cana-de-açúcar transgênica. 2. Calli embrionários. 3. PCR quantitativo.

4. Transformação genética.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pela autora.

Essa ficha não pode ser modificada.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** OBTENÇÃO DE PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR GENETICAMENTE MODIFICADAS SUPEREXPRESSANDO O GENE DIRIGENTE-JACALINA (ShDJ)

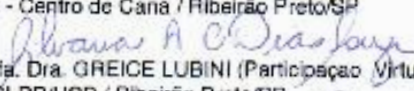
**AUTORA:** CAROLINE FREGONESI

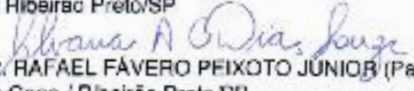
**ORIENTADOR:** DILERMANDO PERECIN

**COORDINADORA:** SILVANA APARECIDA CRESTE DIAS DE SOUZA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:

  
Pesquisadora Dra. SILVANA APARECIDA CRESTE DIAS DE SOUZA (Participação Virtual)  
IAC - Centro de Cana / Ribeirão Preto/SP

  
Prof.ª Dra. GREICE LUBINI (Participação Virtual)  
FFCLRP/USP / Ribeirão Preto/SP

  
Pesquisador Dr. RAFAEL FÁVERO PEIXOTO JUNIOR (Participação Virtual)  
IAC - Centro de Cana / Ribeirão Preto/SP

Jaboticabal, 05 de maio de 2021

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**CAROLINE FREGONESI** – nascida em sete de fevereiro de 1995 em Ribeirão Preto (SP), Brasil, ingressou em 2015, no curso de Tecnologia em Biotecnologia na Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP). Realizou o estágio curricular obrigatório no laboratório de biologia molecular da unidade de Biotecnologia (Universidade de Ribeirão Preto). Em junho de 2017 iniciou estágio no centro de cana do Instituto Agrônomo (IAC), onde também realizou treinamento técnico sob a supervisão da Dra. Silvana Aparecida Creste Dias de Souza, participando de projetos com cana-de-açúcar transgênica. Em 2018 recebeu o grau de bacharel em tecnologia em biotecnologia pela Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP). Ainda em agosto de 2018 ingressou no curso de mestrado pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias) no programa de Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

Aos meus amados irmãos: Pedro, Marcella, Juninho, Marina e Marília,

Aos meus avós: Antônio, Marilda, Marçal e Isaura,

A minha mãe Daniela,

Ao meu pai Marçal,

Aos meus tios Jorge e Diego.

***Dedico.***

## **AGRADECIMENTOS**

Ao programa da pós-graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV/UNESP - Jaboticabal), pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

Ao Instituto Agrônomo de Campinas e Centro de Cana pela oportunidade de desenvolver meu trabalho, e pelo apoio estrutural.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001; e à Fundação de Apoio à Pesquisa Agrícola (Fundag) pela bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro ao projeto (FAPESP 2017/24420-0).

Ao meu orientador Prof. Dr. Dilermando Perecin, por ter me aceitado como aluna e por toda orientação e aprendizado.

À minha co-orientadora Dra. Silvana Aparecida Creste Dias de Souza por todas as oportunidades a mim oferecidas, pela orientação e aprendizado.

À Dra. Larissa Mara de Andrade por todo aprendizado, paciência, carinho, amizade, colaboração e orientação em todas as etapas desse trabalho.

Aos meus queridos amigos Luiz e Paulo pelo companheirismo durante o mestrado.

À Michele Rizzi pela amizade, carinho, paciência e colaboração em todas as etapas de desenvolvimento nesse trabalho.

As minhas queridas amigas Carol, Flávia e Joice, por todo apoio e carinho nessa minha jornada.

Ao meu primo Thiago Nogueira por todo apoio, incentivo e carinho.

A todos meus companheiros estudantes do Centro de Cana – IAC que contribuíram de alguma forma no meu aprendizado, pelo apoio e carinho (Naty, Marina, Marcel, Luiz, Carol, Renato e Gabriel).

A todos os funcionários do Centro de Cana - IAC, (Laboratório de Biotecnologia, Fitopatologia e Biofábrica), por todo carinho e aprendizado.

Ao meu parceiro Raul por todo amor, paciência e incentivo.

À minha família por todo apoio financeiro e psicológico, amor e paciência nessa minha jornada.

À Deus, por me guiar e me abençoar com saúde em todas essas etapas.

**Muito obrigada.**

## SÚMARIO

|                                                                                                  |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| RESUMO.....                                                                                      | ii  |
| ABSTRACT .....                                                                                   | iii |
| LISTA DE FIGURAS .....                                                                           | iv  |
| 1 INTRODUÇÃO.....                                                                                | 1   |
| 3 REVISÃO DE LITERATURA.....                                                                     | 5   |
| 3.1 A Cana-de-açúcar e a biotecnologia na tolerância à seca.....                                 | 5   |
| 3.2 A seca em cana-de-açúcar .....                                                               | 7   |
| 3.3 Dirigente-Jacalina.....                                                                      | 9   |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                        | 14  |
| 4.1 Material .....                                                                               | 14  |
| 4.1.1 Material bacteriano utilizado na construção do vetor e transformação genética de cana..... | 14  |
| 4.1.2 Material vegetal utilizado para a transformação genética de cana.....                      | 14  |
| 4.2 Métodos.....                                                                                 | 14  |
| 4.2.1 Construção do vetor de superexpressão do gene <i>ShDJ</i> .....                            | 14  |
| 4.2.2 Preparação de células eletrocompetentes de <i>E. coli</i> .....                            | 15  |
| 4.2.3 Preparação de células eletrocompetentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ..             | 16  |
| 4.2.4 Transformação de <i>E. coli</i> .....                                                      | 16  |
| 4.2.5 Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....                                    | 17  |
| 4.2.6 Produção de <i>calli</i> embriogênicos de cana-de-açúcar .....                             | 17  |
| 4.2.7 Transformação genética de <i>calli</i> embriogênicos de cana com o gene <i>ShDJ</i> ..     | 18  |
| 4.2.8 Confirmação das Plantas Transgênicas .....                                                 | 19  |
| 4.2.9 Análise de expressão das plantas transgênicas de cana .....                                | 20  |
| 5 RESULTADOS.....                                                                                | 21  |
| 5.1 Detecção de eventos transgênicos superexpressando o gene <i>ShDJ</i> .....                   | 21  |
| 5.2 Expressão gênica do transgene nas plantas de cana-de-açúcar transformadas .....              | 22  |
| 6 DISCUSSÃO.....                                                                                 | 25  |
| 7 CONCLUSÃO .....                                                                                | 29  |
| REFERÊNCIAS.....                                                                                 | 30  |
| APÊNDICE .....                                                                                   | 38  |
| APÊNDICE A - Curva de Melting para detecção de eventos positivos .....                           | 38  |

## OBTENÇÃO DE PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR GENETICAMENTE MODIFICADAS SUPEREXPRESSANDO O GENE DIRIGENTE-JACALINA (*ShDJ*)

**RESUMO** - A cana-de-açúcar é uma das culturas mais importantes do Brasil e é utilizada como matéria-prima para a produção de açúcar e bioetanol. Atualmente, a tolerância à seca é um dos principais focos do desenvolvimento de variedades transgênicas de cana-de-açúcar, uma vez que a deficiência hídrica é o estresse abiótico que mais afeta a produtividade da cultura. Recentemente, o gene *Dirigente-Jacalina* da cana-de-açúcar (*ShDJ*) (pertencente ao grupo das lectinas), cuja função ainda não foi relatada na cana-de-açúcar, foi identificado e avaliado por nosso grupo de pesquisa por meio da superexpressão heteróloga em arroz. Eventos de arroz transgênico superexpressando o gene *ShDJ* mostraram um aumento no conteúdo de biomassa (35-350%) quando submetidas à privação de água, indicando que este gene está envolvido na tolerância à seca. O aumento no conteúdo de biomassa resultou também em um aumento na eficiência de sacarificação de 28% a 132%. Com base nesses resultados, este estudo objetivou transformar duas variedades de cana-de-açúcar com o gene *ShDJ*. Um total de 182 e 50 eventos independentes foram produzidos para as variedades SP80-3280 e IACSP95-5094, respectivamente. Entre os eventos *ShDJ*, 73 plantas SP80-3280 escolhidas randomicamente entre os eventos obtidos e 50 IACSP94-5094 foram confirmadas como transformantes positivos por qPCR em T<sub>0</sub>, sendo todas positivas para inserção de T-DNA. A expressão relativa foi avaliada por qPCR, e a variação na expressão do transgene de eventos *ShDJ* variou de 1,03 a 343 para SP80-3280 e 1,7 a 3050 para IACSP95-5094 quando comparado com plantas não transformadas. Esses eventos serão submetidos em experimentos a campo para avaliação da estabilidade e performance, e poderão, num futuro próximo, contribuir com a matriz energética para a produção de açúcar, etanol e bioenergia.

**Palavras-chave:** Cana-de-açúcar transgênica, *calli* embriogênicos, PCR quantitativo, transformação genética.

## Obtention of genetically modified Sugarcane plants overexpressing Dirigent- Jacalin (*ShDJ*) gene

**ABSTRACT** – Sugarcane is one of the most important crops in Brazil, and it is used as raw material sugar and bioethanol production. Currently, drought tolerance is one of the main focus of transgenic sugarcane varieties development, since water scarcity is the most important abiotic stress that affects crop productivity. Recently, the dirigent-jacalin sugarcane gene (*ShDJ*) (belonging to the lectin group), which function has not yet been reported in sugarcane, was identified and evaluated by our team using heterologous overexpression in rice. Transgenic rice lines overexpressing the *ShDJ* gene showed an increase in biomass content (35-350%) when subjected to water deprivation, indicating that this gene is involved with drought tolerance. The biomass improvement resulting also in an increase in saccharification efficiency ranging from 28% to 132%. Based on these results, aimed to transform two sugarcane varieties with *ShDJ* gene. A total of 182 and 50 independent events were produced for SP80-3280 and IACSP95-5094 varieties, respectively. A set of 73 SP80-3280 chosen randomly from the events obtained and 50 IACSP94-5094 were checked by qPCR in T<sub>0</sub> generation and of all them were positive for insertion of T-DNA. The relative expression of *ShDJ* gene was evaluated by qPCR, and the variation in the transgene expression of *ShDJ* events ranging from 1,03 to 343 for SP80-3280 and 1.7 to 3050 for IACSP95-5094 when compared to untransformed plants. These events will be subject to field experiment in order to evaluate their performance and stability, and could, in the future, contribute with the sugarcane energy matrix in the generation of sugar, ethanol and energy.

**Keywords:** Embryogenic *calli*, genetic transformation, quantitative PCR, sugarcane transgenic plants.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática da região do T-DNA do vetor *pUBIL:ShDJsugar*. RB – Borda direita; LB – borda esquerda; pUBIL – promotor de Ubiquitina do Milho; *nptII* – gene *neomycin phosphotransferase* (marcador de seleção); *ShDJ* – gene Dirigente-Jacalina de cana-de-açúcar; T35S – terminador35S.....14
- Figura 2.** Ilustração das etapas envolvidas na transformação genética de cana. (a) Palmitos de cana-de-açúcar utilizados como fonte de explante; (b) Discos foliares de cana-de-açúcar mantido em meio de cultivo para produção de *calli* embriogênicos; (c) *Calli* embriogênicos utilizados na transformação indireta; (d) Plantas regeneradas de cana-de-açúcar em meio contendo geneticina (50mg.L<sup>-1</sup>) .....16
- Figura 3.** Comparação entre plantas transformadas e não transformadas, com o vetor de superexpressão do gene *ShDJ* sob seleção com o antibiótico geneticina. (A) variedade SP80-3280 e (B) variedade IACSP95-5094 .....20
- Figura 4.** Abundância de transcritos em folhas em 73 eventos independentes da variedade SP80-3280 superexpressando o gene *ShDJ*. Os cálculos foram baseados na fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), onde  $\Delta\Delta CT$  representa a comparação da expressão dos eventos transgênicos em relação as plantas NT. O eixo x representa os valores de expressão dos eventos, e o eixo y os eventos independentes.....22
- Figura 5.** Nível de transcritos em folhas de 50 eventos independentes da variedade IACSP95-5094 superexpressando o gene *ShDJ*. Os cálculos foram baseados na fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), onde  $\Delta\Delta CT$  representa a comparação da expressão dos eventos transgênicos em relação as plantas NT. O eixo x

representa os valores de expressão dos eventos, e o eixo y os eventos independentes.....23

**Figura 6.** Cana-de-açúcar transgênica das variedades IACSP95-5094 e SP80-3280, mantidas em casa de vegetação no centro de cana-IAC(Ribeirão Preto).....27

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos intensificaram-se as buscas por fontes alternativas de energia, em vista da redução ou substituição do uso de combustíveis fósseis. O uso de fontes de energia renováveis, como a cana-de-açúcar (uma monocotiledônea), tem um grande apelo no cenário atual, uma vez que seu crescimento rápido, alta produtividade e baixa demanda energética para a produção estão entre os pré-requisitos para uma cultura ideal (Cheavegatti-Gianotto et al., 2011). Além da sua capacidade de gerar novos colmos em safras subsequentes após a colheita, o que constitui parte importante do ciclo agrícola de produção (Moore et al., 2014).

Mundialmente, a cana é considerada como fonte de matéria-prima para a produção de açúcar e etanol, além da co-geração de energia elétrica, alimentação animal e produção de plásticos biodegradáveis (Dias, 2011). Atualmente, o Brasil destaca-se como maior produtor de cana-de-açúcar no mundo, seguido pela Índia, China e Tailândia, e com estimativa de aumento em 37% da produção mundial até 2028 (FAO, 2019).

Segundo a União da Indústria de Cana-de-açúcar (UNICA,2020), o etanol é um orgulho nacional por sua eficiência energética (fonte limpa e renovável de energia), pela sustentabilidade em toda sua cadeia e pela geração de emprego e renda no campo. Os benefícios ambientais da utilização do etanol estão principalmente relacionados ao balanço energético favorável, com mais de nove unidades de energia renovável geradas para cada unidade de energia fóssil consumida no processo. O etanol diminuiu a emissão de CO<sub>2</sub> em 535 milhões de toneladas até 2019, sendo 90% menos poluente quando comparado a gasolina. (UNICA,2020). Além disso, a utilização do bagaço e da palha da cana na geração de energia elétrica aumenta mais ainda os benefícios sustentáveis, uma vez que a cana produz a maior biomassa em relação à outras culturas bioenergéticas (FAO, 2010).

Todavia, a cana vem sofrendo grandes perdas na produtividade em decorrência das alterações climáticas (Zhao e Li, 2015). Dentre essas alterações está a seca, a qual influencia de forma direta na disponibilidade de água no solo

para os canaviais, reduzindo significativamente os rendimentos da cultura (Teramoto, 2003) capaz de corresponder a 50% das perdas mundiais na produtividade (Bray, 2004). Portanto, o desafio dos programas de melhoramento da cana está em desenvolver variedades com alta produtividade em condição de escassez de água, uma vez que há perspectiva de aumento da temperatura e prolongamento das restrições hídricas (Bruce et al., 2002). Além disso, a expansão do cultivo de cana-de-açúcar para áreas não tradicionais, como oeste de São Paulo, e as regiões de cerrado (Goiás, Triângulo Mineiro e Mato Grosso do Sul) tem demandado o desenvolvimento de variedades mais adaptadas a essas regiões características de déficit hídrico (Oliveira, 2012).

Embora o melhoramento convencional vem obtendo grandes avanços nas últimas décadas, a escassez de informações genéticas e moleculares sobre os mecanismos de tolerância à seca em cana, bem como sua herança são fatores limitantes para o maior sucesso na geração de variedades melhoradas. Portanto, a geração de novas variedades de cana através do melhoramento convencional é uma tarefa desafiadora devido à complexidade do seu genoma (Dermawan et al., 2016), resultando em um processo longo (12 a 15 anos) para a liberação de uma nova variedade com características desejáveis (James, 2007). Assim, a biotecnologia e a genômica funcional têm se tornado ferramentas relevantes e promissoras na identificação de genes-alvos a serem utilizadas na geração de variedades transgênicas, acelerando o desenvolvimento de novas variedades com a introdução de novos genes ou pela manipulação da expressão destes na planta (Andrade et al., 2019). Todavia, a carência de genes plenamente caracterizados que garantam à cana-de-açúcar níveis satisfatórios de produtividade sob seca, constitui um dos principais gargalos para o desenvolvimento de cana transgênica, sob um ponto de vista comercial. Dessa forma, a busca por genes relacionados à tolerância ao estresse por seca em cana-de-açúcar tem sido alvo de vários grupos de pesquisa no mundo (Casu et al. 2007; Iskandar et al. 2011; Rocha et al. 2007; Peixoto-Junior et al. 2018; Andrade et al. 2019).

Nesse sentido, nosso grupo tem dedicado esforços na prospecção e caracterização de genes de cana envolvidos com características capazes de contribuir para o aumento da produtividade dentro de um contexto sustentável,

dentre elas a tolerância à seca. Recentemente, Andrade et al. (2019) identificaram um gene de cana-de-açúcar que se mostrou envolvido com tolerância à seca, através da expressão heteróloga em arroz, uma planta modelo para transformação genética em monocotiledôneas (Tyagi e Mohanty, 2000). O gene Dirigente-Jacalina (*ShDJ*) revelou resultados inéditos na literatura, produzindo plantas tolerantes à seca e com aumento no conteúdo da biomassa (Andrade et al., 2019). Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi transformar variedades de cana-de-açúcar, bem como confirmar e avaliar os eventos transgênicos superexpressando o gene *ShDJ*. Uma vez corroborados os dados com aqueles obtidos em arroz, eventos transgênicos superiores poderão ser clonados e sustentar estudos aprofundados para sua liberação comercial. Portanto, esse estudo pode representar uma tecnologia promissora para o desenvolvimento de variedades de cana transgênicas capazes de manter altos níveis de produtividade sob condições de seca, e com maior acúmulo de biomassa como uma fonte de energia alternativa para as indústrias de etanol de primeira (E1G) e segunda (E2G) geração. Contudo, nossa experiência em genômica funcional também oferece uma oportunidade para antecipar o desenvolvimento de novas plantas transgênicas no contexto da biotecnologia vegetal de terceira geração.

## 2 OBJETIVO

- Transformar as cultivares SP80-3280 e IACSP95-5094 utilizando o vetor *pUBIL::ShDJ<sub>sugar</sub>*, portando o gene de tolerância à seca e aumento de biomassa;
- Confirmar plantas transgênicas e avaliar a expressão do gene *ShDJ* nas linhagens transformadas.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 A Cana-de-açúcar e a biotecnologia na tolerância à seca

A cana-de-açúcar é uma monocotiledônea de metabolismo C4, possuindo altas taxas de eficiência fotossintética (Azania et al. 2013), capaz de acumular açúcar, fibra e água nos seus colmos (Lakshmanan et al., 2005). Ela pertence à família *Poaceae* e gênero *Saccharum*, composta por seis espécies (Watson et al., 1985). As espécies *S. spontaneum* e *S. officinarum* compõem a base das cultivares de cana-de-açúcar mundialmente cultivadas, representadas por híbridos poliplóides interespecíficos (D'hont et al., 1998). Esses híbridos, compreendem um genoma complexo que varia de 100 a 130 cromossomos (D'hont et al., 1996; Piperidis et al., 2000), os quais são constituídos de 70-80% dos cromossomos da espécie parental *S. officinarum*, 10-23% da segunda espécie parental *S. spontaneum* e 8-13% deriva de uma recombinação cromossômica entre as duas espécies (Garsmeur et al., 2011; Piperidis et al., 2000).

O cultivo da cana-de-açúcar no mundo se concentra nas regiões com climas tropical e subtropical, sendo seu provável centro de origem as regiões do norte da Índia e da Nova Guiné (Stevenson, 1965). Ela se desenvolve em condições de alta intensidade de luz solar, altas temperaturas e disponibilidade hídrica (Moore et al., 2014). No Brasil, ela foi introduzida no século XVI pelos portugueses, conquistando o monopólio mundial de produção de açúcar em 1580, e em 1930 iniciaram os estudos para produção de etanol a partir da cana (Maccheroni et al., 2009). As heranças do programa Proálcool foram de grande valia ao setor sucroalcooleiro, colocando o Brasil em posição privilegiada no cenário internacional como líder do mercado produtivo (Goldemberg et al., 2004). A área destinada à atividade sucroalcooleira para a safra 2019/20 foi de 8.442 milhões de hectares, distribuídos em todos os estados produtores, sendo o Estado de São Paulo o maior deles, com 4.427 mil hectares da área total plantada (CONAB, 2020b). E sua produção foi de

642,7 milhões de toneladas, com um acréscimo de 3,5 em relação à safra anterior (CONAB, 2020a).

O objetivo global de substituir o combustível fóssil por fontes alternativas de energia também tem impulsionado a introdução de novas estratégias de pesquisa para aumentar a produtividade da cana-de-açúcar. Avanços tecnológicos nas áreas da biotecnologia e biologia molecular vêm contribuindo com o melhoramento genético convencional de plantas para a produção de variedades com performance melhorada. As ferramentas de biologia molecular possibilitam identificar as vias e os genes que estão envolvidos com características genéticas de interesse comercial, e o aprofundamento em abordagens de genômica funcional possibilitam revelar a função gênica desses genes por meio das plantas transgênicas (Andrade, 2016). Dessa forma, a transformação genética de cana tem o potencial de introduzir uma característica desejada dentro de um genoma complexo (poliplóide e aneuplóide) capaz de transpor as limitações do melhoramento tradicional (Dal-Bianco et al., 2010).

Atualmente, as três gerações de plantas geneticamente modificadas estão distribuídas pelo mundo (Stewart e McLean, 2005). Entretanto, a cana transgênica recentemente liberada apresenta as características da primeira geração, como os genes bioinseticidas. O CTC (Centro de Tecnologia Canavieira) foi pioneiro na liberação da CTC20BT e CTC9001BT para uso comercial, o qual carrega o gene Bt (*Bacillus thuringiensis*) que confere resistência a broca (*Diatraea saccharalis*). Esse gene tem sido usado na agricultura por mais de 20 anos nas culturas de soja, milho e algodão. Portanto, o desenvolvimento de cana geneticamente modificada deve estar focado no aumento da produtividade e tolerância a estresses, com a produção de plantas de terceira geração de OGMs. Embora diversos estudos reportaram cana geneticamente modificada para estresses bióticos e abióticos (Arencibia et al., 1997; Braga et al., 2003; Enríquez-Obregon et al., 1998; Falco et al., 2000, 2003; Gallo-Meagher e Irvine, 1996; Kalunke et al., 2009; Kumar et al., 2014; Leibbrandt e Snyman, 2003; Molinari et al., 2007; Petrasovits et al., 2007; Reis et al., 2014; Sétamou et al., 2002; Zhang et al., 1999, 2006), genes bem caracterizados que garantem níveis satisfatórios de produtividade ainda são o gargalo na geração de variedades transgênicas sob ponto de vista comercial.

Nos últimos anos, o estresse por seca tem sido considerado o principal estresse abiótico na agricultura (CONAB, 2015), particularmente para a cultura da cana-de-açúcar. O estresse por seca influencia de maneira direta no crescimento, nos perfilhos e na altura final dos colmos e, conseqüentemente, na produção de açúcar, provocando a perda significativa de rendimento, principalmente quando o déficit hídrico ocorre nas fases iniciais de crescimentos (Gascho e Shih, 1983; Machado et al., 2009). Poucos trabalhos reportam o desenvolvimento de cana geneticamente modificada com maior tolerância à seca. Zhang et al. (2006) transformaram cana-de-açúcar com o gene *trealose sintase* (Tsase) de *Grifola frondosa*. Os autores verificaram que as plantas transformadas acumularam altos níveis de *trealose* e apresentaram aumento na tolerância à seca (Zhang et al., 2006). Em 2007, Molinari e colaboradores obtiveram plantas de cana geneticamente modificadas superexpressando o gene heterólogo *P5CS* de *V. aconitifolia*, mostrando que o acúmulo do osmólito prolina nos tecidos vegetais tornou a planta tolerante ao déficit hídrico severo, além de ter papel antioxidante da planta, protegendo o aparato fotossintético. Kumar et al. (2014) mostraram que a superexpressão do gene *Arabidopsis Vacuolar Pyrophosphatase* (AVP1) em cana-de-açúcar aumentou a tolerância à seca, além de promover aumento no sistema radicular em relação as plantas não transformadas. Reis e colaboradores (2014) analisaram o efeito da superexpressão constitutiva do gene *AtDREB2A* de *A. thaliana* em cana-de-açúcar e observaram maior conteúdo relativo de água e maior potencial de água nas folhas do que as plantas controles quando expostas à seca, além do maior conteúdo de açúcar e melhor germinação das gemas. Nesse contexto, genes plenamente caracterizados de cana-de-açúcar poderão ser utilizados nos programas de melhoramento para gerar plantas geneticamente modificadas, sendo uma solução bastante viável para a obtenção de genótipos superiores (Andrade, 2016).

### **3.2 A seca em cana-de-açúcar**

As plantas são organismos sésseis que necessariamente desenvolveram várias estratégias para lidar com ambientes mutáveis e, às vezes, extremos, enquanto atendem às demandas de recursos para crescer e completar seu ciclo de vida (Moore et al., 2014). Estresses abióticos, tais como seca, salinidade e baixas temperaturas, causam grandes perdas na agricultura (Guerzoni, 2015). No Brasil e no mundo, dentre estes fatores, a seca afeta uma grande parte das áreas de canavial e é o que mais influencia de forma negativa a produtividade da cana (Jangpromma et al., 2010; Silva et al., 2014).

Na tentativa de minimizar os danos causados pela seca, as plantas possuem diferentes mecanismos para superar a limitação hídrica, os quais conferem diferentes níveis de tolerância à seca. De acordo com Levitt (1972 apud MITRA, 2001), os mecanismos podem ser classificados em três categorias: a) escape, b) evitamento e c) tolerância. O escape é o mecanismo em que a planta finaliza seu ciclo de vida antes da ocorrência de déficit hídrico crítico no solo, e envolve o desenvolvimento fenológico rápido (como florescimento e maturação precoce) e a plasticidade no desenvolvimento (variação do período do crescimento dependendo da duração do déficit hídrico). Já o evitamento protege contra a desidratação dos tecidos através da manutenção do potencial hídrico relativamente elevado mesmo com baixa umidade no solo. Enquanto o mecanismo de tolerância à seca está associado à capacidade da planta em manter a homeostase celular mesmo com baixos conteúdos de água nos tecidos através da manutenção do turgor da célula por meio do ajuste osmótico, aumento na elasticidade e diminuição do tamanho da célula, e na tolerância à dessecação pela resistência protoplasmática (Levitt, 1972 apud MITRA, 2001). As plantas quando submetidas à seca podem usar mais de um desses mecanismos simultaneamente para tolerar o estresse.

O entendimento de como as plantas respondem aos estresses ambientais é fundamental para a sustentabilidade de sistemas agrícolas. No entanto, a resposta da planta à seca é um fenômeno complexo, especialmente com um genoma poliplóide como a cana-de-açúcar (Grivet e Arruda, 2001), que acarreta em uma complexa via de respostas que podem envolver mudanças metabólicas, mecânicas e/ou oxidativas (Larcher, 2000). Essas mudanças podem ser desencadeadas com a modificação na conformação de proteínas, com a alteração na expressão gênica

(Bray, 1997) que, juntamente com estudos fisiológicos e bioquímicos, permitem elucidar os mecanismos envolvidos na tolerância à seca (Ingram e Bartels, 1996). Estudos de Shinozaki e colaboradores (2003) classificaram as proteínas envolvidas no mecanismo de resposta ao estresse em dois grupos: i) proteínas efetoras, relacionadas a tolerância à seca, como as proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant proteins), aquaporinas, genes detoxificantes, chaperonas e osmoprotetores (como prolina, e entre outras); e ii) as proteínas regulatórias, que contêm as proteínas envolvidas na transdução de sinal e os fatores de transcrição. Dessa forma, a busca por genes relacionados a resposta ao estresse por seca e a compreensão dos mecanismos de defesa em cana-de-açúcar tem sido alvo de vários grupos de pesquisa no mundo (Casu et al., 2007; Iskandar et al., 2011; Rocha et al., 2007).

O Programa Cana IAC vem conduzindo projetos de pesquisa visando identificar genes de cana-de-açúcar envolvidos na tolerância à seca. Estudos de transcriptoma de variedades IAC submetidas à seca gerou um banco de dados rico em genes diferencialmente expressos, e possivelmente envolvidos na resposta à seca (Oliveira, 2012). A caracterização dos genes alvos poderá contribuir com o desenvolvimento de cultivares de cana geneticamente modificadas com maior tolerância ao déficit hídrico, via análise funcional através da transformação genética. Dessa forma, com a expressão heteróloga em arroz, Peixoto-Júnior et al. (2018) e Andrade et al. (2019) avaliaram os genes *ScMYBAS1* e *ShDJ* provenientes dos bancos de dados, e mostraram o envolvimento dos mesmos na tolerância à seca. O estudo em genômica funcional oferece uma oportunidade para colaborar com o desenvolvimento de novas variedades de plantas.

### **3.3 Dirigente-Jacalina**

Estresses abióticos induzem uma ampla gama de mecanismos moleculares, bioquímicos e alterações fisiológicas nas plantas, incluindo acúmulo de osmólitos, fotossíntese reduzida, fechamento de estômatos e indução de genes responsivos ao

estresse (YamaguchiShinozaki e Shinozaki, 2006; Lata et al., 2015). Um desses mecanismos envolve pequenas moléculas sinalizadoras como o hormônio jasmonato, o qual está envolvido na resposta a estresses biótico (Wasternack, 2007) e abiótico (Muñoz-Espinoza et al. 2015; de Ollas e Dodd 2016).

O jasmonato (JAs) é conhecido como regulador natural de crescimento das plantas (Ghasemi Pirbalouti et al., 2014), além de modulador de estresse, alterando o nível de expressão de diversos genes responsivos a ele, podendo reprimir ou aumentar respostas ao estresse das plantas (Agrawal et al., 2003). Dentre as proteínas responsivas ao jasmonato estão as lectinas. As lectinas, também chamadas de aglutininas ou as fitohemaglutininas (Van Damme,1998), são proteínas de ligação de açúcar com pelo menos um domínio não catalítico que lhes permite reconhecer seletivamente e se ligar reversivelmente a carboidratos específicos (Lannoo e Van Damme,2014), mediando diversos processos biológicos.

As lectinas são encontradas desde em vírus até humanos (Schutter e Van Damme, 2015) e podem ser classificadas em quatro grupos de acordo com a estrutura da molécula (merolectinas, hololetinas, quimerolectinas e superlectinas) ou em doze famílias de acordo com o domínio de reconhecimento aos carboidratos (ABA - *Agaricus bisporus* agglutinin; Amaranthin; CRA - chitinase-related agglutinin; Cyanovirin; EEA - *Euonymus europaeus* agglutinin; GNA - *Galanthus nivalis* agglutinin; Hevein; Jacalinas; Legume lectin; LysM - lysin motif; Nictaba; e Ricin\_B) (Van Damme et al., 2008). A família das jacalinas (jacalin-related lectins/JRLs) foram associadas com resistência a doenças, sinalização de estresse abiótico, ferimentos e danos por insetos (Song et al., 2014). As JRLs percebem os estímulos externos pelos receptores de membrana do seu domínio e iniciam uma cascata de sinalização nas células, que podem ser a ativação de fatores de transcrição, fosforilação de proteínas ou modulação de fitohormônios (Schutter e Van Damme, 2015).

As JRLs apresentam o domínio jacalina em diferentes números de cópias, como também podem estar na forma quimérica (quimerolectinas), i.e., ligadas a outros domínios não relacionados (Jiang; Ma; Ramachandran, 2010), sugerindo uma divergência funcional devido sua heterogeneidade estrutural (Song et al., 2014). Curiosamente, várias dessas proteínas quiméricas contêm domínios relacionados à

resposta e defesa ao estresse (Schutter e Van Damme, 2015). Dentre as diferentes JRLs quiméricas, está a jacalina associada ao domínio dirigente (Jiang et al., 2010). As proteínas que contêm um domínio dirigente N-terminal e um domínio jacalina C-terminal, exclusivas de monocotiledônea, foram identificadas em milho, sorgo (Esen e Blanchard, 2000; Kittur et al. 2009), arroz (Jiang et al., 2007), trigo (Gorlach et al. 1996; Subramanyam et al. 2008; Wang e Ma, 2005; Yong et al. 2003) e cana (Nóbile et al., 2017; Andrade et al., 2019). Os autores Kittur et al. (2010) e Ma et al. (2013) deletaram o domínio dirigente N-terminal associadas ao domínio jacalina a fim de avaliar a ligação das proteínas DJ aos açúcares ao qual essas lectinas mostram especificidade. Em milho e trigo, as proteínas quiméricas beta-glucosidase-aggregating factor (BGAF) tiveram sua especificidade afetada quando o domínio dirigente foi deletado (KITUR et al., 2010), enquanto em trigo a deleção do domínio dirigente da TaJA1 não alterou a especificidade da ligação ao seu açúcar (MA et al., 2013). Em arroz (*Oryza sativa*) a proteína OsJRL foi regulada positivamente após o tratamento com vários estresses abióticos, sal, seca, frio calor e ácido abscísico (He et al., 2016).

Estudos de função biológica envolvendo os domínios dirigente e DJ foram caracterizados em arroz, *Boea hygrometrica* e trigo. Plantas de arroz transgênicas com superexpressão de OsJAC1 indicaram a importância do gene para o crescimento e desenvolvimento do arroz (Jiang et al., 2007). Uma proteína com domínio dirigente de *Boea hygrometrica* (BhDIR1) já foi relacionada com resposta à desidratação, estímulos hormonais e estresse por temperatura (WU et al., 2009). Análises de estresse abiótico, biótico e por hormônio mostraram que os genes que codificam a proteína quimérica DJ foram induzidos em grande parte pelo estresse abiótico, sugerindo que são cruciais para a adaptação das plantas às condições ambientais adversas em trigo (Song et al., 2014).

Em cana-de-açúcar, alguns estudos foram relatados nas classes de proteínas contendo o domínio dirigente (Casu et al., 2004; Damaj et al., 2010; Jin-Long et al., 2012; Nóbile et al., 2017), o domínio jacalina (JRL) (Falco et al., 2001; Casu et al., 2004) e dirigente-jacalina (Andrade et al., 2019). Quanto aos estudos sobre o domínio dirigente, Casu e colaboradores (2004) encontraram contigs correspondentes as proteínas dirigent-like e jacalin-like nas bibliotecas de colmo

maduro de cana quando comparadas as sequências de monocotiledôneas já descritas na literatura. Damaj et al., (2010) estudaram o comportamento do promotor do gene dirigente DIR16 fusionado ao gene repórter GUS, e observaram que a expressão do gene GUS foi reforçada no colmo e induzida na raiz e nas folhas sob ácido salicílico, ácido jasmonico e metil jasmonato (reguladores dos estresses biótico e abiótico). Ainda segundo os autores, a utilização da construção *DIR16:GUS* permitiu uma maior análise de genes funcionais em monocotiledôneas (arroz, milho e sorgo), melhorando o metabolismo de carbono, aumento de tolerância à estresses e produção de bioenergia (Damaj et al., 2010). Jin-Long et al. (2012), analisaram a expressão heteróloga da *ScDIR* em *E. coli* e o nível de expressão em plântulas de cana-de-açúcar sob os estresses por seca (PEG), oxidativo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e salino (NaCl). Tanto em *E. coli* quanto em plântulas, o gene *ScDIR* mostrou-se envolvido na resposta a indutores de estresses abióticos, com sua expressão aumentada sob essas condições. O estudo mais recente da proteína dirigente foi realizado por Nobile e colaboradores (2017) em cana-de-açúcar. Os autores caracterizaram a família de proteínas contendo o domínio dirigente (Dir) e identificaram 6,7% de jacalinas quiméricas contendo o domínio Dir e ressaltaram que esse número é uma indicação de que essa proteína pode ter um papel metabólico importante podendo também estar associadas a mecanismos de defesa das plantas. Já o estudo do domínio jacalina, Falco et al. (2001), apresentaram uma revisão dos mecanismos de defesa cana-de-açúcar a insetos, onde identificaram vários genes, dentre eles uma jacalina, através de análises *in silico* no banco de dados SUCEST.

Em 2019, Andrade et al. avaliaram funcionalmente uma JRL associada a um domínio dirigente (*ShDJ*) de cana-de-açúcar através da expressão heteróloga em arroz. Os autores observaram que as plantas que superexpressaram o gene teve seu crescimento e desenvolvimento não afetados sob condição de seca. Além da tolerância à seca, os eventos-elite apresentaram um aumento significativo da biomassa com alta eficiência de sacarificação. A prova de conceito utilizando o gene *ShDJ* em cana poderá elucidar a função do gene no genoma de origem. Portanto, nossos resultados podem representar uma tecnologia promissora para o desenvolvimento de variedades de cana transgênicas capazes de manter altos

níveis de produtividade sob condições de déficit hídrico, e com maior acúmulo de biomassa como uma fonte de energia alternativa para as indústrias de etanol de primeira (E1G) e segunda (E2G) geração.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Material**

#### **4.1.1 Material bacteriano utilizado na construção do vetor e transformação genética de cana**

Em todas as etapas de clonagem para a construção do vetor de superexpressão foram utilizadas bactérias *E. coli* eletrocompetente da cepa DH10B. Após a obtenção do vetor de superexpressão, a bactéria *Agrobacterium tumefaciens* (cepa AGL1) foi utilizada para a transformação genética de *calli* embriogênicos de cana.

#### **4.1.2 Material vegetal utilizado para a transformação genética de cana**

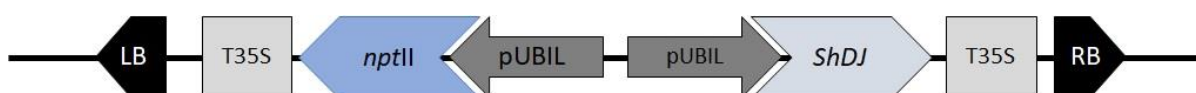
Na transformação genética de cana foram utilizados palmitos (10 cm) provenientes dos ponteiros das variedades IACSP95-5094 e SP80-3280 com idade entre 6 a 9 meses. A partir dos palmitos, foram produzidos *calli* embriogênicos para posterior transformação genética via *A. tumefaciens* contendo o vetor com o gene *ShDJ*.

### **4.2 Métodos**

#### **4.2.1 Construção do vetor de superexpressão do gene *ShDJ***

O vetor de superexpressão do gene *ShDJ* em variedades de cana-de-açúcar foi construído a partir do inserto contendo o gene *ShDJ* (NCBI - MK000560),

proveniente de vetor *pUBIL::ShDJ* obtido em trabalho anterior do nosso grupo (ANDRADE et al., 2019). Para isolamento do gene e futura inserção no vetor *pJFNPTII*, gentilmente cedido pelo Dr. Fredy Altpeter, da Universidade da Flórida (ALTPETER et al., 2000), foram utilizadas duas enzimas de restrição Bam HI e Sac I (New England BioLabs) para digestão de ambos os vetores. A reação de ligação do vetor *pJFNPTII* e do inserto contendo cassete de expressão de *Dirigente-Jacalina* (Figura 1) foi feita com T4 DNA ligase (Invitrogen) para obtenção do vetor *pUBIL::ShDJ*sugar.



**Figura 1.** Representação esquemática da região do T-DNA do vetor *pUBIL::ShDJ*sugar. RB – Borda direita; LB – borda esquerda; pUBIL – promotor de Ubiquitina do Milho; nptII – gene neomicina fosfotransferase (marcador de seleção); *ShDJ* – gene Dirigente-Jacalina de cana-de-açúcar; T35S – terminador35S.

#### 4.2.2 Preparação de células eletrocompetentes de *E. coli*

O protocolo utilizado para obtenção de células eletrocompetentes consistiu em utilizar uma colônia isolada da *E.coli*, (cepa DH10B) de meio LB sólido (1,5% m/v) com 50mg/L de estreptomicina para o pré-inóculo em meio LB líquido com a mesma concentração de antibiótico. O Crescimento do pré-inóculo ocorreu durante 16 horas a 37°C e sob agitação de 210rpm. Foi transferido 5ml do pré-inóculo para erlenmeyer de 1L contendo 350ml de meio LB líquido, que foi mantido por aproximadamente 2h a 37°C, sob agitação de 210rpm até o crescimento exponencial (atingido o ponto ideal Abs<sub>600nm</sub> entre 0,3 e 0,35). As células foram então submetidas a banho de gelo por 30 minutos, transferidas para tubos de

centrifugação estéreis e centrifugadas a 4.000rpm por 10 minutos, a 4°C. Retirou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 50ml de água estéril a 4°C. Centrifugou-se novamente a 4.000rpm por 10 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 25ml de água estéril gelada. O sobrenadante foi descartado, e desta vez as células foram ressuspensas em 10ml de glicerol 10% v/v gelado. Após nova centrifugação as células foram ressuspensas em um volume final de 500µl de glicerol 10% v/v gelado e alíquotas com 40µl em tubos de 1,5ml foram posteriormente estocadas a -80°C.

#### **4.2.3 Preparação de células eletrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens***

O protocolo empregado para obtenção de células eletrocompetentes consistiu em inocular uma colônia isolada de *Agrobacterium tumefaciens* (cepa AGL1) de meio YEB sólido (1,5% m/v) com 50mg/L de rifampicina para o pré-inóculo em meio YEB líquido com a mesma concentração de antibiótico. O crescimento do pré-inóculo ocorreu sob 28°C a 220 rpm, overnight. Foi transferido 5ml do pré-inóculo para erlenmeyer de 1L contendo 200ml de meio YEB líquido, que foi mantido sob agitação de 210rpm, à 25–28°C até o crescimento exponencial (atingido o ponto ideal Abs<sub>600nm</sub> entre 0,5 e 1,0). As células foram então submetidas a banho de gelo por 30 minutos, transferidas para tubos de centrifugação estéreis e centrifugadas a 5.000x por 10 minutos, a 4°C. Retirou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 50ml de água estéril a 4°C. Centrifugou-se novamente a 5.000xg por 10 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com solução de glicerol 10% v/v gelado. Após nova centrifugação as células foram ressuspensas em um volume final de 800µl de glicerol 10% v/v gelado e alíquotas com 40µl em tubos de 1,5ml foram posteriormente estocadas a -80°C.

#### **4.2.4 Transformação de *E. coli***

Células competentes de *E. coli* (item 3.1.1) foram transformadas com o vetor de superexpressão *pUBIL:ShDJsugar* por eletroporação em cubetas de 1mm no GenePulser Xcell™ Electroporation Systems (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) a 1800 Volts (25µF capacitância, 200Ω de resistência). Clones positivos foram confirmados através de PCR de colônia (GoTaq® G2 DNA Polymerase), sendo utilizado ao final o kit Wizard Plus SV miniprep DNA purification System (PROMEGA) para isolamento do plasmídeo de colônia positiva.

#### **4.2.5 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens***

A *Agrobacterium tumefaciens* (item 3.1.1) foi transformada com o vetor *pUBIL::ShDJsugar* por eletroporação em cubetas de 1mm no GenePulser Xcell™ Electroporation Systems (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) a 2200 Volts (25µF capacitância, 200Ω de resistência). A colônia utilizada na transformação genética foi armazenada em glicerol 25% a -80°C.

#### **4.2.6 Produção de *calli* embriogênicos de cana-de-açúcar**

Nos experimentos de transformação genética de cana, *calli* embriogênicos foram produzidos a partir de palmitos das variedades IACSP95-5094 e SP80-3280 (item 3.1.2). Os palmitos foram desinfectados com álcool 70% e Tween 20 (Monolaurato de Sorbitan Etoxilado 20 EO) por 2 minutos e enxaguados três vezes com água Mili-Q autoclavada. A seguir, os palmitos foram submetidos à uma solução com hipoclorito de sódio a 2% v/v e Tween 20 por 25 minutos sob agitação, e novamente enxaguados com água Milli-Q autoclavada e solução antioxidante (ác. Ascórbico 0,05g/l e ác. Cítrico 0,075g/l).

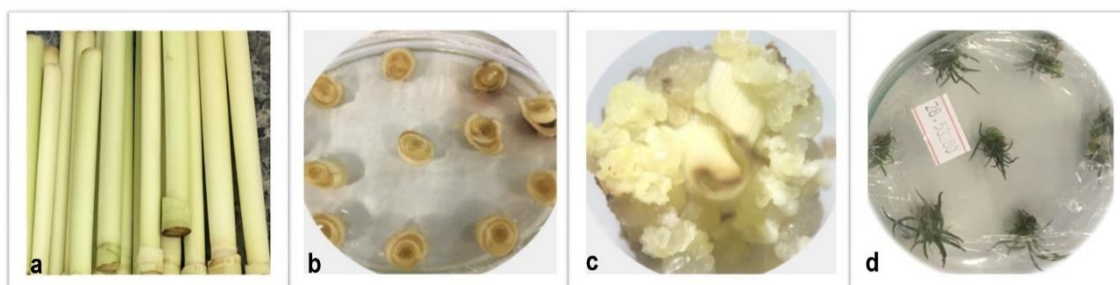
Discos foliares de 2mm previamente desinfectados foram colocados em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) sólido (gelrite 4% m/v) contendo 3mg/L de 2,4D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) para indução de *calli* embriogênicos. As placas

contendo os discos foram mantidas no escuro, a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , subcultivados a cada 2 semanas, durante 45 dias, para o desenvolvimento e a multiplicação dos *calli* embriogênicos.

#### 4.2.7 Transformação genética de *calli* embriogênicos de cana com o gene *ShDJ*

Nos experimentos de transformação genética em cana, *calli* embriogênicos das variedades IACSP95-5094 e SP80-3280 foram transformados *via Agrobacterium*, utilizando-se o protocolo de transformação do Centro de Cana (Patente Número BR 10 2020 015354 4). Os *calli* embriogênicos foram inoculados em suspensão de *Agrobacterium* em OD<sub>600nm</sub> específica, por 20min, em meio MS contendo acetoseringona.

Após, os explantes foram deixados secar sobre papel filtro estéril, em fluxo laminar, por 30 minutos. Em seguida, foram transferidos para placas de Petri e co-cultivados no escuro a  $22^\circ\text{C}$  por 3 dias. Após, foram transferidos para o meio de descanso de *calli* embriogênicos suplementado com 20mg/L de Meropenem, e incubados no escuro a  $25^\circ\text{C}$  por 15 dias. A seguir, os *calli* embriogênicos foram transferidos para o meio de regeneração seletivo, contendo geneticina (50mg/L), sendo subcultivados a cada 15 dias, para regeneração e desenvolvimento das plantas transformadas (Figura 2).



**Figura 2.** Ilustração das etapas envolvidas na transformação genética de cana. (a) Palmitos de cana-de-açúcar utilizados como fonte de explante; (b) Discos foliares de cana-de-açúcar mantido em meio de cultivo para produção de

*calli* embriogênicos; (c) *Calli* embriogênicos utilizados na transformação indireta; (d) Plantas regeneradas de cana-de-açúcar em meio contendo geneticina ( $50\text{mg.L}^{-1}$ ).

#### 4.2.8 Confirmação das Plantas Transgênicas

A confirmação de eventos transgênicos ( $T_0$ ) de cana foi realizada a partir do DNA genômico de plantas regeneradas via qPCR, utilizando um par de primers que flanqueia o gene marcador de seleção geneticina (*nptII* - Tabela 1). O DNA de folhas de cana transgênica e plantas não transformadas (NT) foi extraído utilizando o kit GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep (Sigma-Aldrich, Spruce Street, St Louis), conforme as instruções do fabricante. As concentrações do DNA foram determinadas no espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) e a integridade e qualidade foram checadas em eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio ( $0,1\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

As plantas transgênicas foram confirmadas utilizando a concentração de 120ng de DNA e primers específicos para o gene *nptII*. As análises foram realizadas em termociclador StepOnePlus System (Applied Biosystems, Foster City, CA, United States), com as condições de ciclagem de temperatura inicial de  $95^\circ\text{C}$  por 2 minutos, seguidos por 40 ciclos de  $95^\circ\text{C}$  por 15s,  $60^\circ\text{C}$  por 1minuto. A curva de dissociação (TM) foi obtida entre  $72^\circ\text{C}$  e  $95^\circ\text{C}$ , e o branco (sem DNA ou cDNA) também foi incluído. A reação foi composta por  $6,25\mu\text{L}$  de GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Fitchburg, WI, United States), de  $0,5\mu\text{M}$  de cada primer,  $0,125\mu\text{L}$  de CXR e água ultrapura (Milli-Q) estéril, para um volume final de  $12,5\mu\text{L}$ . A detecção dos transgênicos foram realizadas através da temperatura de melting da qPCR (Apêndice 1).

**Tabela 1.** Tabela de primers contendo a descrição dos genes e as sequências dos pares de primer nos sentidos direto (F) e reverso (R)

| Descrição do gene                | F (5' - 3')                 | R (5' - 3')                 |
|----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <b>Geneticina (<i>nptII</i>)</b> | ctc gtc aag aag gcg ata gaa | cgt tgg cta ccc gtg ata tt  |
| <b><i>ShDJ</i></b>               | aga act ggg gag ggg aac a   | ttt ggt ggc tct gtg atg tct |

#### 4.2.9 Análise de expressão das plantas transgênicas de cana

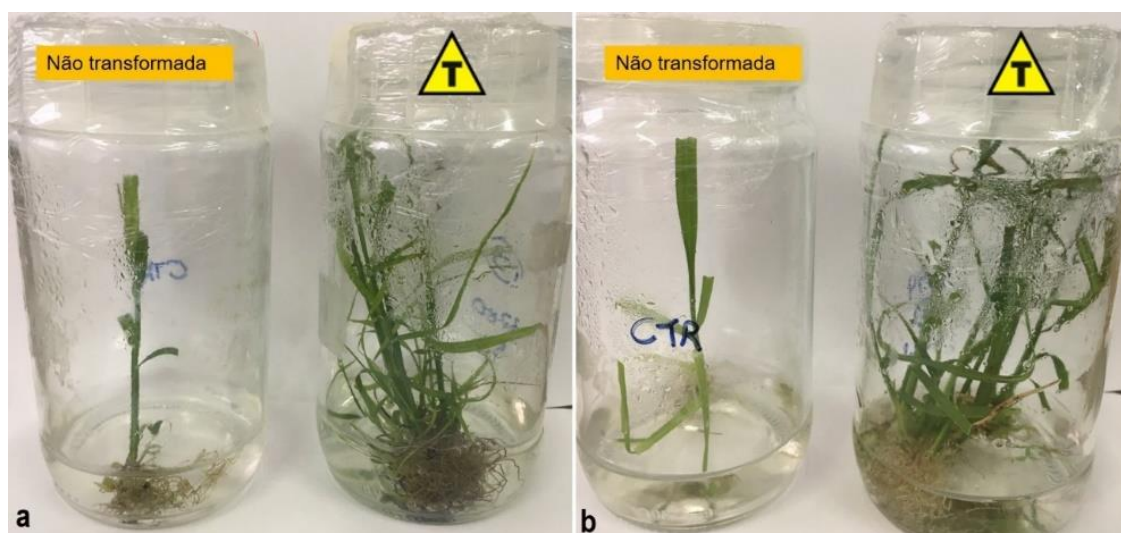
Na análise da expressão do transgene em plantas de cana transformadas, o RNA total foi isolado a partir da folha (+1) utilizando o kit PureLink RNA (Invitrogen Life Technologies, United States), de acordo com o fabricante. Na sequência, o DNA genômico co-precipitado foi removido utilizando a DNase I (Promega, Fitchburg, WI, USA). As concentrações de RNA foram determinadas no espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) e a integridade e qualidade foram checadas em eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (0, 1µg.mL<sup>-1</sup>). A síntese de cDNA foi realizada a partir de 1 µg de RNA, utilizando-se o kit *GoScript™ Reverse Transcription* (Promega, Fitchburg, WI, USA), conforme instruções do fabricante.

As análises de expressão do transgene foram realizadas nas plantas transgênicas confirmadas (T<sub>0</sub>) e plantas NT, utilizando cDNA na diluição 1:10 e primers específicos do gene *ShDJ* (Tabela 1). A expressão do transgene foi avaliada pelo método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak e Schmittgen 2001), utilizando o gene GAPDH (NCBI-CA094944) como controle endógeno para normalizar a variação entre as amostras (Andrade et al. 2017). As análises foram realizadas em termociclador StepOnePlus System (Applied Biosystems, Foster City, CA, United States), conforme descrito no item 3.2.3.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Detecção de eventos transgênicos superexpressando o gene *ShDJ*

Com o intuito de se investigar o papel do gene *ShDJ* na tolerância à seca, o vetor de superexpressão *pUBIL:ShDJ<sub>sugar</sub>* foi construído e utilizado na transformação das variedades SP80-3280 e IACSP95-5094 de cana-de-açúcar. Como evento independente considerou-se a planta proveniente de um único *callus* embriogênico, transformado e regenerado em meio seletivo suplementado com geneticina. Um total de 182 e 50 plantas foram regeneradas para SP80-3280 e IACSP95-5094, respectivamente. Destes, 73 eventos da SP80-3280 e todos os eventos da IACSP94-5094 foram escolhidos, para confirmação do transgene por meio do marcador de seleção *nptII*, utilizando a qPCR. Os resultados evidenciaram que houve inserção do transgene em todos os eventos avaliados, confirmando a eficiência da metodologia de transformação utilizada. Nas plantas transgênicas mantidas sob cultivo *in vitro*, foi observada uma abundância no sistema radicular e maior número de perfilhos, quando comparadas às plantas NT, conforme ilustrado na figura 3.



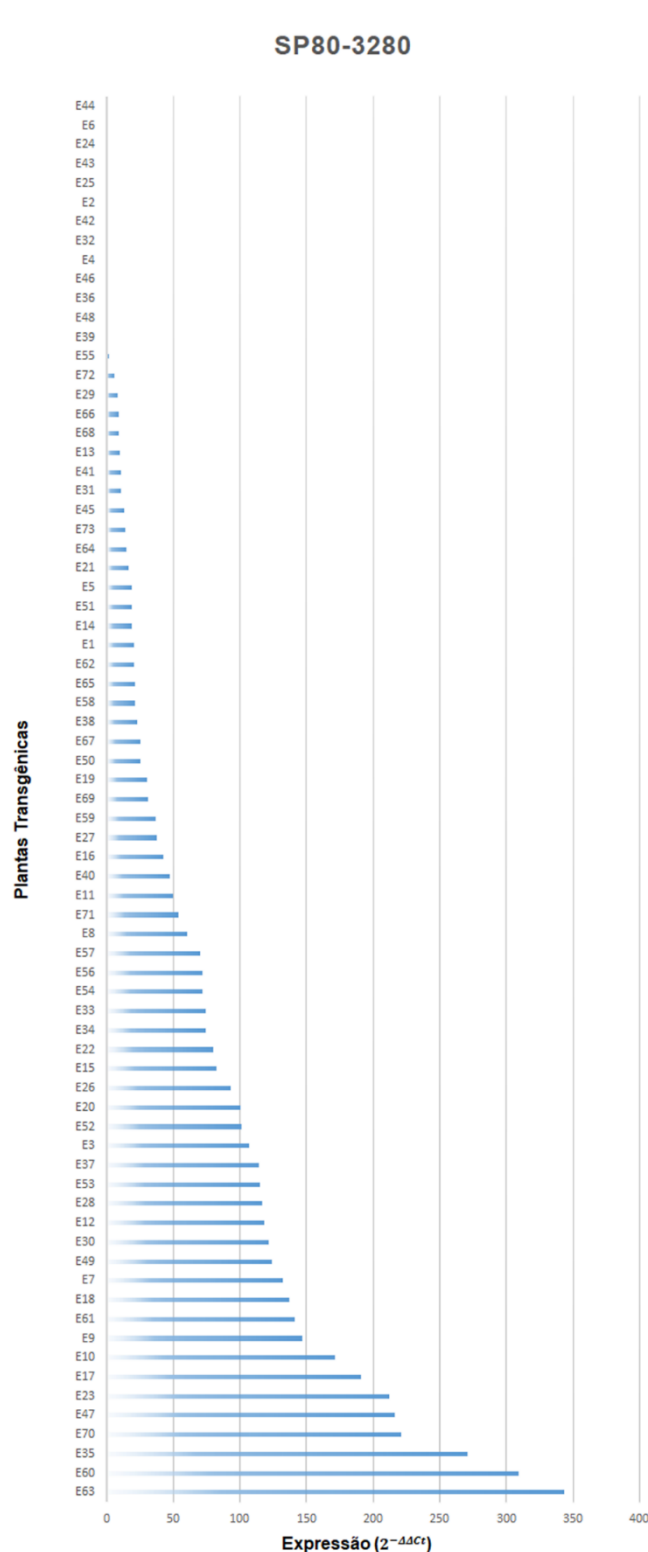
**Figura 3.** Comparação entre plantas transformadas e não transformadas, com o vetor de superexpressão do gene *ShDJ* sob seleção com o antibiótico geneticina. (A) variedade SP80-3280 e (B) variedade IACSP95-5094.

## 5.2 Expressão gênica do transgene nas plantas de cana-de-açúcar transformadas

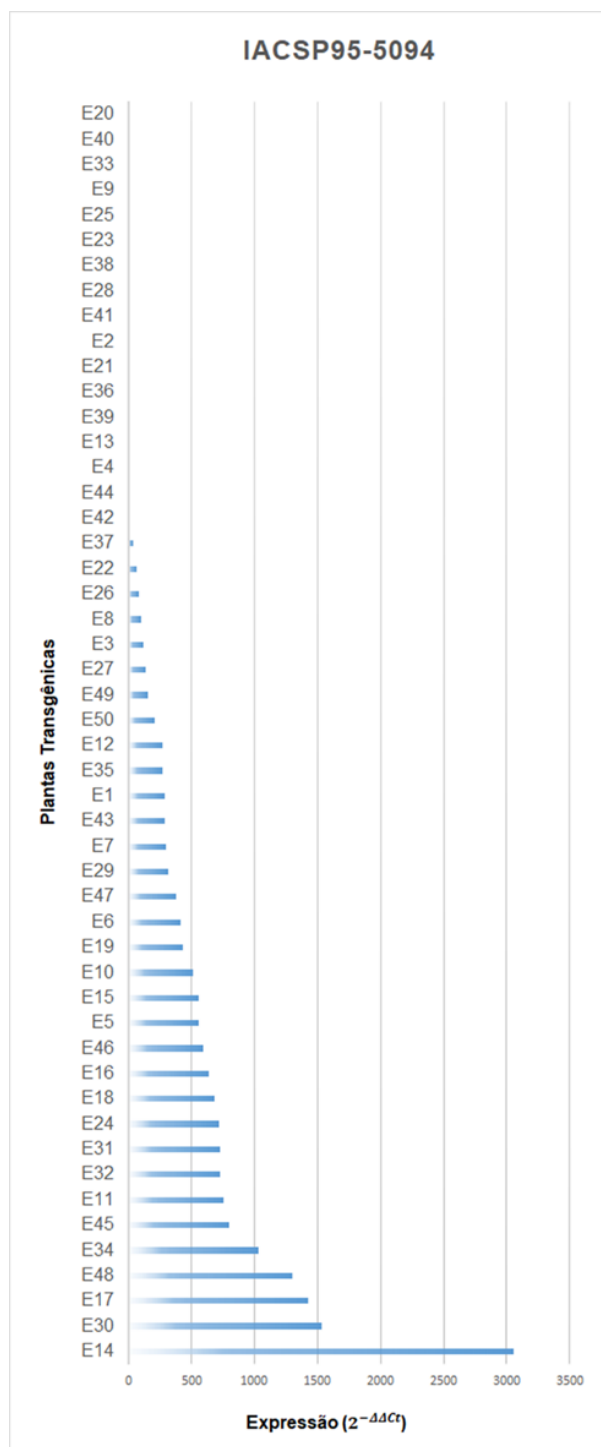
A análise de expressão dos eventos confirmados foi realizada, de acordo com o item 3.2.7. O nível de expressão representa a média de três replicatas técnicas das plantas provenientes do cultivo *in vitro* (T<sub>0</sub>). Primers específicos foram desenhados na região do gene *ShDJ*, a fim de anelar tanto no gene endógeno quanto no gene inserido no genoma. A expressão dos genes foi verificada por qPCR baseado no perfil de expressão pelo cálculo  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (Livak e Schmittgen, 2001), onde  $\Delta\Delta C_T$  representa a comparação da expressão dos eventos transgênicos em relação as plantas NT, utilizando o GAPDH como gene normalizador (Andrade et al. 2017).

A quantificação de transcritos do gene *ShDJ* nos eventos transgênicos da variedade SP80-3280 mostrou uma variação na abundância de 1,03 (E48) a 343 (E63) vezes em relação as plantas NT. Dentre as 73 plantas avaliadas, 11 eventos tiveram a expressão menor quando comparados as plantas NT, sendo E44 a com menor expressão (Figura 4). Já na variedade IACSP95-5094, a expressão variou de 1,7 (E25) a 3050 (E14) para as plantas que apresentaram expressão maior que as plantas NT. Todavia, quatro plantas apresentaram expressão menor que as plantas NT, sendo a E20 a com menor abundância de transcritos (Figura 5).

As plantas transgênicas que apresentaram expressão aumentada serão submetidas a experimentação a campo, em parceria com a empresa Granbio para análises biométricas e bioquímicas, bem como a tolerância à seca.



**Figura 4.** Abundância de transcritos em folhas em 73 eventos independentes da variedade SP80-3280 superexpressando o gene *ShDJ*. Os cálculos foram baseados na fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001), onde  $\Delta\Delta CT$  representa a comparação da expressão dos eventos transgênicos em relação as plantas NT. O eixo y representa os eventos independentes, e o eixo x representa os valores de expressão dos eventos.



**Figura 5.** Nível de transcritos em folhas de 50 eventos independentes da variedade IACSP95-5094 superexpressando o gene *ShDJ*. Os cálculos foram baseados na fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001), onde  $\Delta\Delta CT$  representa a comparação da expressão dos eventos transgênicos em relação as plantas NT. O eixo y representa os os eventos independentes, e o eixo x os valores de expressão dos eventos.

## 6 DISCUSSÃO

A obtenção de variedades de cana capazes de manter altos níveis de produtividade em ambientes restritivos representa um dos maiores desafios dos programas de melhoramento genético desta cultura. Portanto, o desenvolvimento de variedades de cana provenientes da engenharia genética, embora desafiador, apresenta-se como uma grande oportunidade de obtenção de uma agricultura mais eficiente e sustentável.

Em cana, a carência de genes plenamente caracterizados, aptos a serem utilizados como alvos na obtenção de variedades transgênicas, constitui num dos principais gargalos para a geração de plantas transformadas, sob o ponto de vista comercial. Até o momento, não há estudos envolvendo a caracterização funcional, em cana, do gene que codifica as proteínas quiméricas *ShDJ*, com foco na tolerância à seca. Os trabalhos existentes com caracterização de gene/promotor de cana-de-açúcar envolvidos com resposta à seca foram realizados apenas nos genes com domínio único dirigente (Damaj et al. 2010; Jin-Long et al. 2012). Todavia, Andrade e colaboradores (2019) caracterizaram pela primeira vez o gene *ShDJ* de cana-de-açúcar através da expressão heteróloga em arroz. Os eventos transgênicos de arroz superexpressando o gene *ShDJ* apresentaram tolerância à seca (Andrade et al. 2019). Os autores observaram também a manutenção do crescimento e do desenvolvimento das plantas sob condição de seca, onde a produção de biomassa, refletida pelo peso seco de parte aérea e de raiz, bem como número de perfilhos, variou de 35-350% nos eventos transgênicos de arroz obtidos. Esses resultados levaram os autores a submeter um pedido de proteção intelectual da tecnologia envolvendo o gene *ShDJ* (patente depositada INPI BR 10 2017 016521 3). Análises complementares de composição de parede celular (hemicelulose, celulose e pectina) e conteúdo de lignina não apresentaram relação com o incremento na biomassa, mas a melhora na sacarificação foi observada para os eventos-elite avaliados. Dessa forma, os autores sugeriram que o gene *ShDJ* de cana-de-açúcar exerce um papel importante no desenvolvimento e crescimento das plantas, já que sua super-expressão resultou no aumento de biomassa. Uma vez que as plantas foram

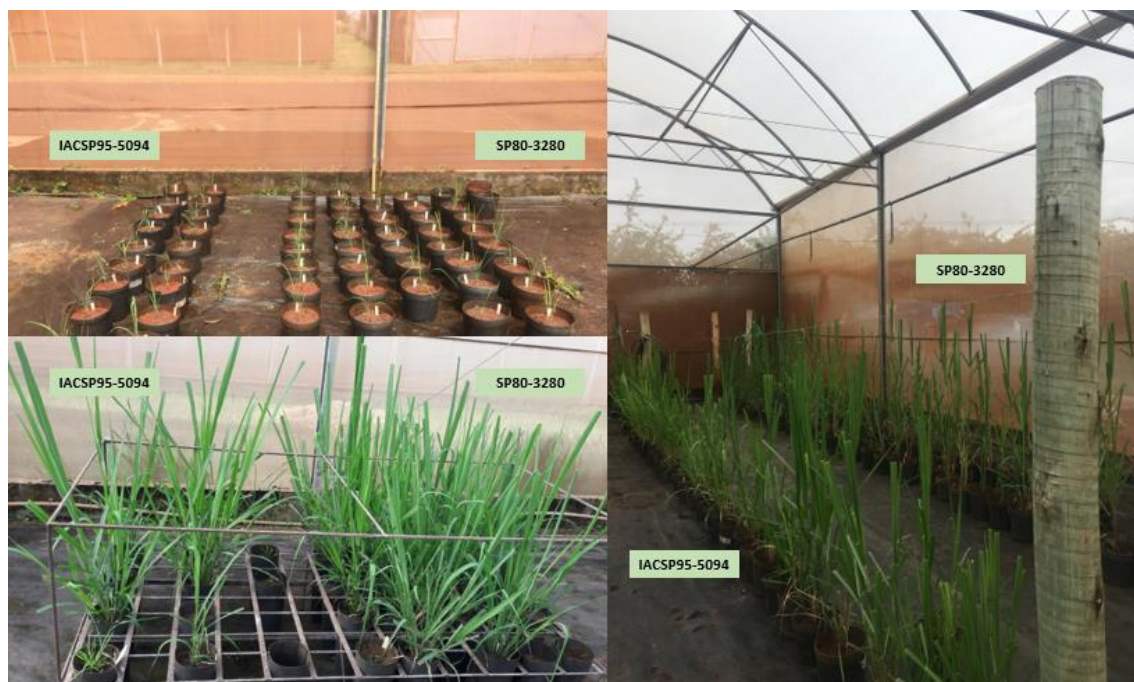
capazes de manter a produtividade mesmo sob condição de restrição hídrica, os autores sugerem que o gene *ShDJ* tem papel na tolerância à seca, visto que, quando desafiadas pelo estresse, as plantas não tiveram seu desenvolvimento afetado. Esses resultados corroboram com Mitra (2001), de que a tolerância à seca corresponde a habilidade de uma planta produzir seu produto econômico, com mínima perda, em um ambiente com condições restritivas de água. Portanto, os resultados obtidos por Andrade et al. (2019) mostrou que a relação do gene *ShDJ* com a tolerância à seca e o acúmulo de biomassa o constitui como um candidato extremamente interessante na geração de cultivares de cana energia visando a produção de etanol de segunda geração (E2G), bem como para a co-geração de energia.

O etanol de segunda geração ou etanol celulósico, apresenta vantagens ambientais e econômicas, por ser o etanol produzido a partir de lignocelulose, presente em resíduos de origem vegetal (Pacheco, 2011). O E2G é obtido através do processamento do bagaço após a extração do caldo ou mesmo da palha remanescente da colheita. Por meio de um processo chamado de hidrólise que liquefaz as fibras de um vegetal com o uso de ácidos ou enzimas específicas o bagaço e a palha tornam-se aproveitáveis, produzindo-se mais etanol (até 50%) a partir desse caldo hidrolisado (Lorenzi e Andrade, 2019). A produção de etanol 2G através da utilização da biomassa lignocelulósica permite aumentar a produtividade de etanol por hectare de cana-de-açúcar plantada (Cerqueira Leite et al., 2009), elevando assim os níveis de produção de etanol sem aumentar a área plantada (Pacheco, 2011).

Por esses motivos, fez-se necessário realizar a transformação com o gene *ShDJ*, por meio da sua superexpressão em eventos transgênicos de cana-de-açúcar. A variedade SP80-3280 foi utilizada nesse estudo por tratar-se de um genótipo modelo do protocolo de transformação utilizado para fins de teste de vetor, uma vez que ela apresenta alta eficiência de transformação. Além disso, a SP80-3280 apresenta grande quantidade de informações em banco de dados, sendo usada como modelo de análises genômicas no Brasil. A variedade de cana-de-açúcar IACSP95-5094 é filha da SP80-3280 e atualmente representa a principal

variedade de cana do Programa Cana IAC, com características de alta produtividade, resistência a doenças e adaptada a colheita mecanizada.

Todas as plantas transformadas avaliadas foram positivas (100%) para a inserção do marcador de seleção *nptII*, *certificando alta eficiência de transformação e de regeneração dos calli embriogênicos*. A abundância de transcritos do gene *ShDJ* para a variedade SP80-3280 variou de 1,03 à 343 vezes, enquanto para a variedade IACSP95-5094, a expressão variou de 1,7 a 3050 vezes quando comparadas as plantas não transformadas. Todos os eventos aqui obtidos foram mantidos em casa de vegetação como demonstrado na figura 6. Os eventos que apresentaram alta expressão das duas variedades serão submetidos a ensaios de campo, para avaliação da estabilidade e da performance das plantas (análises fenotípicas e de tolerância à seca), afim de selecionar eventos promissores. Essas análises serão realizadas em parceria com a empresa Granbio, seguindo os procedimentos requeridos pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). Eventos elites serão selecionados para posteriores análises bioquímicas de parede celular e da eficiência de sacarificação.



**Figura 6.** Cana-de-açúcar transgênica das variedades IACSP95-5094 e SP80-3280, mantidas em casa de vegetação no centro de cana-IAC (Ribeirão Preto).

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com a transformação genética, via *Agrobacterium tumefaciens* das variedades IACSP95-5094 e SP80-3280 de cana-de-açúcar, a partir do palmito como fonte de explante, apresentaram uma grande produção de *calli* embriogênicos e altas taxas de transformação, com a inserção do transgene em todos os eventos avaliados. As análises de expressão nos eventos analisados mostraram alta abundância de transcritos a partir da superexpressão do gene *ShDJ* inserido. Dessa forma, se os estudos a campo a serem realizados nas plantas de cana transgênicas apresentarem resultados colineares com aqueles obtidos pela caracterização funcional em arroz, poderão, num futuro próximo, representar um importante insumo biotecnológico na indústria de açúcar e E1G e E2G, ao promover maior produtividade da cana em ambientes sujeitos ao déficit hídrico, além de promover a melhora do processo de sacarificação na indústria de E2G. Como pode ser observado em arroz, a manipulação de um único gene da própria planta poderá permitir a melhoria de duas características de fundamental importância no melhoramento genético: aumento de produtividade e tolerância a estresse abiótico, além da melhoria da qualidade da matéria prima na indústria de etanol 2G. Com o advento das tecnologias de edição gênica, a expressão da *ShDJ* poderá ser finalmente regulada de forma a garantir a máxima performance da planta, contornando as questões regulatórias que recaem atualmente sobre a liberação de plantas transgênicas. Além disso, a colinearidade existente entre espécies vegetais possibilitará que a tecnologia aqui descrita seja transferida a outras culturas de alto valor comercial, por meio da identificação de ortólogos *ShDJ* em culturas específicas.

## REFERÊNCIAS

- Agrawal, G.K., Tamogami, S., Iwahashi, H., Agrawal, V.P., Rakwal, R., (2003). Transient regulation of jasmonic acid-inducible rice MAP Kinase gene (OsBWK1) by diverse biotic and abiotic stresses. **Plant Physiol. Biochem.** 41, 355-361.
- Andrade, L.M. (2016). **Caracterização dos genes dirigente-jacalina e deidrina de cana-deaçúcar e seu papel na tolerância a seca, por meio da expressão heteróloga em arroz.** P147. Tese (Doutorado em Genética) – USP, Ribeirão Preto.
- Andrade, Larissa Mara; Brito, Michael; Peixoto Junior, Rafael; *et al.* (2017). Reference genes for normalization of qPCR assays in sugarcane plants under water deficit. **Plant Methods**, 13:1–9.
- Andrade, Larissa Mara; Peixoto-Junior, Rafael Fávero; Ribeiro, Rafael Vasconcelos; *et al.* (2019). Biomass accumulation and cell wall structure of rice plants overexpressing a dirigent-jacalin of sugarcane (*ShDJ*) under varying conditions of water availability. **Frontiers in Plant Science**, 10:1–15.
- Arencibia, A. D.; Carmona E R.; Tellez P.; Chan M-T.; YU S-M.; Trujillo L. E.; Oramas P. (1997). An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Transgenic Research**, 7:213-222.
- Braga, D. P. V.; Arrigoni, E. D. B.; Silva-Filho, M. C.; Ulian, E. C. (2003). Expression of the Cry1Ab protein in genetically modified sugarcane for the control of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal New Seeds**. 5: 209–222.
- Bray, E. A. (2004). Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, 55:2331-41.
- Bray, E. A. (1997). Plant responses to water deficit. **Trends in Plant Science**. 2:48-54.
- Bruce, W. B.; Edmeades, G. O.; Barker, T. C. (2002). Molecular and physiological approaches to maize improvement for drought tolerance. **Journal of Experimental Botany**, 53:13–25.
- Casu, R.E. *et al.* (2004). Identification of differentially expressed transcripts from maturing stem of sugarcane by in silico analysis of stem expressed sequence tags and gene expression profiling. **Plant Molecular Biology**, 54:503-517.
- Casu, R.E. *et al.* (2007). Identification of Transcripts Associated with Cell Wall Metabolism and Development in the Stem of Sugarcane by Affymetrix Genechip

Sugarcane Genome Array Expression Profiling. **Functional and Integrative Genomics**, 7:153-167.

Cerqueira-Leite, R. C.; Leal, M. R. L. V.; Cortez, L. A. B.; Griffin, W. M.; Scandiffio, M. I. G. (2009). Can Brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol? **Energy**. 34:655-661.

Cheavegatti-Gianotto, A.; Abreu, H. M. C. De; Arruda, P. et al. (2011). Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil. **Tropical plant biology**, 4:62-89.

**Companhia Nacional De Abastecimento** – CONAB (a). Acomp. Safra bras. Cana, v. 6 - Safra 2019/20, n. 4 - Quarto levantamento, Brasília, p. 1-62, abril 2020.

**Companhia Nacional De Abastecimento** – CONAB (b). Acomp. Safra bras. Cana, v. 7 - Safra 2020/21, n. 3 - Terceiro levantamento, Brasília, p. 1-62, dezembro 2020.

**Companhia Nacional De Abastecimento** - CONAB. (2015). Acompanhamento de safra brasileira de cana-de-açúcar, v.1 – Safra 2014/15, n. 4 - Quarto Levantamento, Brasília, 29p.

Dal-Bianco, M. et al (2012). Sugarcane improvement: how far can we go? **Current Opinion Biotechnology**, 23:265-270.

Damaj, M. et al (2010). Sugarcane DIRIGENT and O-METHYLTRANSFERASE promoters confer stem-regulated gene expression in diverse monocots. **Planta**, 231:1439- 1458.

De Ollas, Carlos; Dodd, Ian C. (2016). Physiological impacts of ABA–JA interactions under water-limitation. **Plant Molecular Biology**, 91:641–650.

Dermawan, H. et al. (2016). Development of an intragenic gene transfer and selection protocol for sugarcane resulting in resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicide. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 126:459-468.

Dias, M.O.S. et al. (2011). Simulation of integrated first and second generation bioethanol production from sugarcane: comparison between different biomass pretreatment methods. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 38:955-966.

D'hont, A. et al. (1996). Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. **Molecular and General Genetics** MGG, 250:405-413.

D'hont, A. et al. (1998). Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. **Genome**, 41:221-225.

Enriquez-Obregon, G. A. et al. (1998). Herbicide resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. **Planta**, v. 206:20-27.

Esen, A.; Blanchard, D.J. (2000). A specific beta-glucosidase-aggregating factor is responsible for the beta-glucosidase null phenotype in maize. **Plant Physiology**. 122:563-572.

Falco, M.C. et al. Mechanisms of sugarcane response to herbivory. (2001) **Genetic and Molecular Biology**, 24:113–122.

Falco; M. C.; Neto; A. T.; Ulian; E. C. (2000). Transformation and expression of a gene for herbicide resistance in a Brazilian sugarcane. **Plant Cell Report**. 19:1188–1194.

Falco; M. C.; Silva-Filho; M. C. (2003). Expression of soybean proteinase inhibitors in transgenic sugarcane plants: effects on natural defense against *Diatraea saccharalis*. **Plant Physiology and Biochemistry**. 41:761-766.

Fávero Peixoto, Rafael; Mara de Andrade, Larissa; Dos Santos Brito, Michael; *et al.* (2018). Overexpression of ScMYBAS1 alternative splicing transcripts differentially impacts biomass accumulation and drought tolerance in rice transgenic plants. **PLoS ONE**, 13:1–20.

Food and Agricultural Organization of the United Nations (2019). FAO. <<http://www.fao.org/faostat/en/?#data/QC/visualize>>. Last accessed: 26 fev. 2021.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2010) FAO.Global sugarcane production statistics.

Gallo-Meagher, M. & Irvine, J.E. (1996) Herbicide resistant transgenic sugarcane plants containing the bar gene. **Crop Science**, 36:1367–1374.

Garsmeur, O. et al. (2011). High homologous gene conservation despite extreme autopolyploid redundancy in sugarcane. **New Phytologist**, 189:629–642.

Gascho, G. J.; Shih; S. F. (1983). SUGARCANE. In: Teare; I.D.; Peet; M.M. (Ed.). Crop-Water relations. **New York: John Wiley**, p.445-479.

Ghasemi Pirbalouti, A., Sajjadi,S.E., Parang,k. (2014). A review (research and patents) on jasmonic acid and its derivatives.Arch.**Pharm**.34: 229-239.

Goldemberg; J.; Coelho; S.T.; Guardabassi; P. (2008). The sustainability of ethanol production from sugarcane. **Energy Policy**. 36:2086-2097.

Gorlach, J. et al. (1996). Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. **Plant Cell**, 8:629-643.

Grivet; L.; Arruda; P. (2001). Sugarcane genomes: depicting the complex genome of an important tropical crop. *Current Opinion in Plant Biology*. 5:122–127.

Guerzoni JTS (2015) **Expressão da proteína quinase de nicotiana (npk1) aumenta a tolerância à seca em cana-de-açúcar transgênica**. 91 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Produção Vegetal) – UFPR, Curitiba.

He, X., Li, L., Xu, H., Xi, J., Cao, X., Xu, H., et al. (2016). A rice jacalin-related mannose-binding lectin gene, OsJRL, enhances *Escherichia coli* viability under high salinity stress and improves salinity tolerance of rice. *Plant Biol*. 19:257–267

Ingram, J.; Bartels, D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47:377–403.

Iskandar, H.M. et al. (2011). Identification of drought-response genes and a study of their expression during sucrose accumulation and water deficit in sugarcane culms. *BMC Plant Biology*.11:1-14.

James G (2007) Sugarcane. Blackwell, **Oxford**.

Jangpromma N, Songsri P, Thammasirirak S, Jaisil P. (2010). Rapid assessment of chlorophyll content in sugarcane using a spad chlorophyll meter across different water stress conditions. *Asian Journal Plant Scie*. 9:368–374.

Jiang, J.F.; Xu, Y.Y.; Chong, K. (2007). Overexpression of OsJAC1, a lectin gene, suppresses the coleoptile and stem elongation in rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49:230–237.

Jiang, S.Y.; Ma, Z.; Ramachandran, S. (2010). Evolutionary history and stress regulation of the lectin superfamily in higher plants. *BMC Evolutionary Biology*, 10:79.

Jin-Long, Guo; Li-Ping, Xu; Jing-Ping, Fang; et al. (2012). A novel dirigent protein gene with highly stem-specific expression from sugarcane, response to drought, salt and oxidative stresses. *Plant Cell Reports*, n. 10, 31:1801–1812.

Kalunke, R. M. et al. (2009). *Agrobacterium* mediated transformation of sugarcane for borer resistance using cry 1Aa3 gene and one step regeneration of transgenic plants. *Sugar Tech*, 11:355-359.

Kittur, F.S. et al. (2009). Homolog of the maize b-glucosidase aggregating factor from sorghum is a jacalin-related GalNAc-specific lectin but lacks protein aggregating activity. *Glycobiology*, 19:277-287.

Kittur, F.S. et al. (2010). Deletion of the N-terminal dirigent domain in maize ??-glucosidase aggregating factor and its homolog sorghum lectin dramatically alters the

sugarspecificities of their lectin domains. **Plant Physiology and Biochemistry**, 48: 731- 734.

Kumar, T. et al. (2014). Genetic improvement of sugarcane for drought and salinity stress tolerance using *Arabidopsis* vacuolar pyrophosphatase (AVP1) gene. **Molecular Biotechnology**, 56:199-209.

Lannoo, N.; Van Damme, E.J. (2014). Lectin domains at the frontiers of plant defense. **Plant Sci.**

Lakshmanan, P. et al. (2005). Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. **In Vitro Cellular and Development Biology Plant**, 41:345–363.

Larcher, W. (2000). *Ecofisiologia vegetal*. São Carlos: **Rima Artes & Textos**, 531.

Lata, C., Muthamilarasan, M., and Prasad, M. (2015). “Drought stress responses and signal transduction in plants,” in *Elucidation of Abiotic Stress Signaling in Plants*, ed G. K. Pandey. **New York, NY: Springer**, 195–225.

Leibbrandt, N.B. & Snyman, S.J. (2003) Stability of gene expression and agronomic performance of a transgenic herbicide-resistant sugarcane line in South Africa. **Crop Science**, 43:671–677.

Levitt; J. (1972). Responses of plants to environmental stresses. **New York: Academic Press**.

Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ . **Methods**, 25:402-408.

Lorenzi, Bruno Rossi; DE Andrade, Thales Haddad Novaes. (2019). Second generation ethanol in Brazil: Policies and socio-technical networks. **Revista Brasileira de Ciencias Sociais**, v. 34, n. 100.

Ma, Q-H.; Zhen, W-B.; Liu, Y-C. (2013) Jacalin domain in wheat jasmonate-regulated protein Ta-JA1 confers agglutinating activity and pathogen resistance. **Biochimie**, 95:359- 365.

Machado R.S., Ribeiro R.V., Marchiori P.E.R. et al. (2009). Biometric and physiological responses to water deficit in sugarcane at different phenological stages. **Pesquisa agropecuária brasileira**. 44:1575–1582.

Maccheroni; W.; Jordão; H.; DE Gaspari; R.; Moura; G.L.; Matsuoka; L. (2009). Development of a dependable microsatellite-based. **Sugarcane International**. n:2,27:8-13.

Mathias Azania, C. A. et al. (2013). The Use of Glyphosate in Sugarcane: A Brazilian Experience. *Herbicides - Current Research and Case Studies in Use*.

Mitra, J. (2001). Genetics and genetic improvement of drought resistance in crop plantas. **Current Science**, 80:758-764.

Molinari, H.B.C. et al. (2007). Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, 130:218-229.

Moore, P. H., Paterson, A. H., & Tew, T. (2014). Sugarcane: the crop, the plant, and domestication. **Sugarcane: physiology, biochemistry, and functional biology**, 1-17.

Muñoz-Espinoza, V. A., López-Climent, M. F., Casaretto, J. A., and Gómez-Cadenas, A. (2015). Water stress responses of tomato mutants impaired in hormone biosynthesis reveal abscisic acid, jasmonic acid and salicylic acid interactions. **Front. Plant Sci.** 6:997.

Murashige, T.; Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15:473–97.

Nobile, P. M., Bottcher, A., Mayer, J. L. S., Brito, M. S., Dos Anjos, I. A., Landell, M. G. A., et al. (2017). Identification, classification and transcriptional profiles of dirigent domain-containing proteins in sugarcane. *Mol. Genet.* **Genomics** 292:1323–1340.

Oliveira, J.F.N.C. (2012). **Caracterização fisiológica e perfil de expressão gênica de cultivares de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) contrastantes para o déficit hídrico**. Tese (Doutorado em Ciencias (Genética e melhoramento de plantas) – USP, Piracicaba.

Pacheco, T. F. (2011). **Produção de Etanol: Primeira ou Segunda Geração?** 1: 6.

Petrasovits, L.A., Purnell, M.P., Nielsen, L.K., et al. (2007) Production of polyhydroxybutyrate in sugarcane. **Plant Biotechnology Journal**, 5:162–172.

Piperidis, G. et al. (2000). Molecular contribution to selection of intergeneric hybrids between sugarcane and the wild species *Erianthus arundinaceus*. **Genome**, n. 643:1033- 1037.

Reis, R. R., da Cunha, B. A., Martins, P. K., Martins, M. T., Alekcevetch, J. C., Chalfun, A. Jr., et al. (2014). Induced over-expression of AtDREB2A CA improves drought tolerance in sugarcane. **Plant Sci.** 221-222:59–68.

Rocha, F.R. et al. (2007). Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. **BMC Genomics**, 8:71.

Schutter, K.; Van Damme, E. (2015). Protein-Carbohydrate Interactions as Part of Plant Defense and Animal Immunity. **Molecules**, 20:9029-9053.

Setamou, M. et al. (2002). Evaluation of lectin-expressing transgenic sugarcane against stalkborers (Lepidoptera: Pyralidae): effects on life history parameters. **Journal of Economic Entomology**, v. 95, n. 2, p. 469-477, 2002.

Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki K. (2003). Monitoring expression profiles of rice genes under cold; drought; and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA get-blot analyses. **Plant Physiology**. 133:1755-17.

Silva, M. A; John, J. L; Da Silva, J. A. G; Santos, C.; Sharma M. (2014). Relationships between physiological traits and productivity of sugarcane in response to water deficit. **Jounal Agriculture Science**. 152:104–118.

Song, M. et al. (2014). Association of jacalin-related lectins with wheat responses to stresses revealed by transcriptional profiling. **Plant Molecular Biology**, 84:95-110.

Stevenson, G.C. (1965). Genetics and breeding of sugar cane. **London: Longmans**, 284.

Stewart, P. A.; Mclean, W. P. (2005). Public Opinion Toward the First, Second, and Third Generations of Plant Biotechnology. In Vitro Cellular Dev. Biol. **Plant**, 41: 718–724.

Subramanyam, S. et al. (2008). Functional characterization of HFR1, a high mannose Nglycan-specific wheat lectin induced by Hessian fly larvae. **Plant Physiology**, 147:1412-1426.

Teramoto, E. R. (2003). Estimativa de produção de cana-de-açúcar (*saccharum spp*) baseados em parâmetros do solo e do clima estimativa de produção de cana-de-açúcar (*saccharum spp*) baseados em parâmetros do solo e do clima.

Tyagi, A. K., and Mohanty, A. (2000). Rice transformation for crop improvement and functional genomics. **Plant Sci**. 158, 1–18.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. (2020). Setor-Etanol. [www.unica.com.br](http://www.unica.com.br). Acesso em: fev. 2021.

Van Damme, E. J. M., Peumans, W. J., Barre, A., and Rougé, P. (1998). Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. Crit. Rev. **Plant Sci**. 17:575–69.

Van Damme, E.J.M.; Lannoo, N.; Peumans, W.J. (2008). Plant lectins. **Advances Botanical Research**, 48:107-209.

Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2006). Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. Annu. Rev. **Plant Biol**. 57:781–803.

Yong, W.D. (2003). Vernalization-induced flowering in wheat is mediated by a lectin-like gene VER2. **Planta**, 217: 261-270.

Wang, X.M.; Ma, Q.H. (2005). Characterization of a jasmonate-regulated wheat protein related to a beta-glucosidase-aggregating factor. **Plant Physiology and Biochemistry**, 43:185-192.

Wasternack, C. (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal, transduction and action in plant stress response, growth and development. **Annals of Botany**, 100:681-697.

Watson, L.; Clifftort, H.T.; Dallwitz, M.J. (1985) The classification of Poaceae; subfamilies and supertribes. **Australian Journal of Botany**, 33: 433-484.

Wu, R. et al. (2009). Cloning and expression analysis of a dirigent protein gene from the resurrection plant *Boea hygrometrica*. **Progress in Natural Science**, 19:347-352.

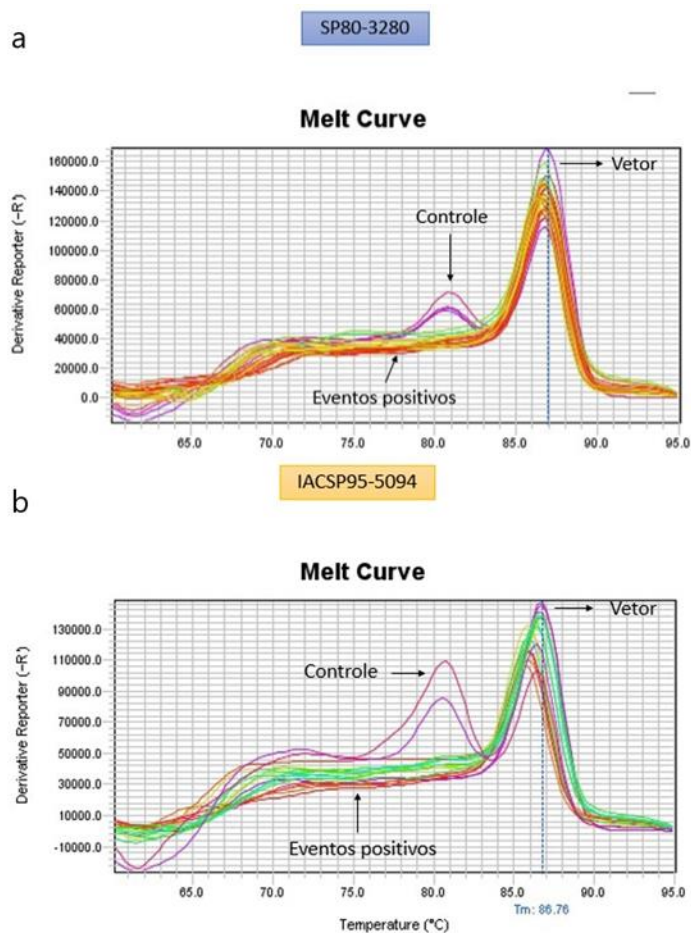
Zhang, I.; Xu, J.; Birch, R. G. (1999). Engineered detoxification confers resistance against a pathogenic bacterium. **Nature Biotechnology**, n. 10, 17:1021-1024.

Zhang, S. Z.; Yang, B. P.; Feng, C. L.; Chen, R. K.; Luo; J. P.; Cai; W. W.; Liu; F. H. (2006). Expression of the *Grifola frondosa* trehalose synthase gene and improvement of droughttolerance in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Journal Integrative Plant Biology**. v. 48; p. 453–459.

Zhao, D., and Li, Y.-R. (2015). Climate change and sugarcane production: potential impact and mitigation strategies. **Int. J. Agron**. 547-386.

## APÊNDICE

### APÊNDICE A - Curva de Melting para detecção de eventos positivos



**Figura 1A.** (a) Gráfico da curva de melting para detecção de eventos positivos da variedade SP80-3280; (b) Gráfico da curva de melting para a detecção de eventos positivos da variedade IACSP95-5094.