



**13º Congresso Interinstitucional de Iniciação
Científica - CIIC 2019
30 e 31 de julho de 2019 - Campinas, São Paulo
ISBN: 978-85-7029-149-3**

**LIBERAÇÃO PLANEJADA NO MEIO AMBIENTE (LPMA) DE PLANTAS
TRANSGÊNICAS DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Talita **Heleodoro**¹; Ana Paula **Ribeiro**²; Hugo **Molinari**³; Adilson A. **Kobayashi**⁴; Felipe **Vinecky**⁵;
Paulo Cezar **De Luca**⁶; Paulo **Arruda**⁷; Ricardo A. **Dante**⁸; Isabel R. **Gerhardt**⁹; Juliana Erika
Teixeira **Yassitepe**¹⁰; Fernanda R. **Fernades**¹¹; Geraldo M. A. **Cançado**¹²

Nº 19605

RESUMO – A utilização das técnicas de modificação genética de plantas já são aplicadas comercialmente na agricultura a cerca de três décadas. No entanto, culturas como a cana-de-açúcar ainda se beneficiam pouco desta tecnologia. O presente trabalho descreve a liberação planejada e controlada no meio ambiente (LPMA) de dois eventos de cana-de-açúcar geneticamente modificados visando aumento da tolerância ao estresse hídrico. O objetivo é avaliar o efeito dos transgenes em condições controladas de cultivo sob irrigação e seca no campo. Para tanto, a área onde o experimento foi instalado teve que atender aos critérios de biossegurança exigidos pela CTNBio, tais como possuir o Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB) e ter a aprovação prévia da LPMA pela CTNBio.

Palavras-chaves: *Saccharum* ssp, OGM, tolerância a seca, biotecnologia vegetal

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Biologia, PUCC, Campinas-SP. talitahleodoro@gmail.com

2 Pós-doutoranda FAPESP

3-5 Pesquisador Embrapa Agroenergia, Brasília-DF.

6 Pangeia Biotech, Campinas-SP.

7 Professor do Instituto de Biologia, Unicamp, Campinas-SP.

8-11 Pesquisador Embrapa Informática Agropecuária, Campinas-SP.

12 Orientador: Pesquisador da Embrapa Informática Agropecuária, Campinas-SP; geraldo.cancado@embrapa.br



**13º Congresso Interinstitucional de Iniciação
Científica - CIIC 2019
30 e 31 de julho de 2019 - Campinas, São Paulo
ISBN: 978-85-7029-149-3**

ABSTRACT – *The use of techniques of genetic modification in plants has been applied commercially in agriculture for about three decades so far. However, crops such as sugarcane still get almost no benefit from this technology. The current work describes the planned and controlled introduction into the environment of two distinct genetically engineered sugarcanes potentially tolerant to drought stress. The aim of this work is evaluate the response of transgenic sugarcane during the experimental conditions of irrigation and drought under field condition. In order to achieve that, the experimental field where the genetically modified sugarcane were cultivated has been adapted to meet all requirements established by CTNBio regulations, such as the Certificate of Biosafety Quality and the previous approval of CTNBio for the environment introduction of genetic modified organisms.*

Keywords: *Saccharum* ssp, GMO, drought tolerance, plant biotechnology

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar representa, desde o início da colonização do Brasil, uma importante fonte de alimentos, como o açúcar, a rapadura e a cachaça. Os subprodutos do seu processamento são usados para a produção de ração para a alimentação animal e papel (STUPIELLO, 1987) e mais recentemente, moléculas biodegradáveis aplicadas na indústria de embalagens. Atualmente, o Brasil é o maior exportador de etanol e o segundo maior produtor, após os Estados Unidos. Todo etanol brasileiro é produzido a partir da cana-de-açúcar (CONAB, 2018). Além disso, vale salientar a importância da produção de energia elétrica, gerada a partir da queima do bagaço proveniente da extração do caldo, que vem assumindo um papel cada vez mais significativo no balanço financeiro das usinas. A produção da cana-de-açúcar no Brasil está concentrada principalmente nas regiões Centro-Sul e Nordeste e ocupa uma área de aproximadamente 8 milhões de hectares. Em espécies de importância comercial, procura-se obter a maior produtividade possível dentro de um curto espaço de tempo aliado à preservação do meio ambiente. Dentro disso, a transformação genética de plantas se mostra uma alternativa atrativa para a geração de variedades de cana-de-açúcar mais eficientes. O presente trabalho relata a liberação planejada no meio ambiente de eventos geneticamente modificados de cana-de-açúcar da variedade SP 80-3280 para duas construções gênicas distintas, ou seja, plantas de cana-de-açúcar que tiveram seu DNA genômico



**13º Congresso Interinstitucional de Iniciação
Científica - CIIC 2019
30 e 31 de julho de 2019 - Campinas, São Paulo
ISBN: 978-85-7029-149-3**

modificado de forma herdável pela inserção da sequência codificante dos genes de interesse que no caso são genes exógenos (oriundos de outros organismos vivos distintos da cana-de-açúcar). Para cada construção gênica foram gerados em torno de 15 eventos positivos que passaram por uma etapa intermediária de seleção em casa-de-vegetação, onde 6 eventos por construção foram selecionados. Posteriormente, na etapa atual de avaliação no campo, 3 destes eventos serão selecionados para a etapa final de avaliação no campo por dois ciclos de produção correspondentes a safra de “cana planta” e a safra de “cana soca”. As normas para execução de LPMA de Organismos Geneticamente Modificados de origem vegetal e seus derivados no meio ambiente são estabelecidas pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) e estão descritas na resolução normativa nº 06 (RN-06) publicada em 2008 (<http://ctnbio.mcti.gov.br/resolucoes-normativas/>). Resumidamente, a RN-06 considera os critérios de risco envolvidos com a liberação do OGM no campo e estabelece as condições necessárias para que a liberação seja conduzida de forma a não provocar nenhum dano ambiental e nenhum dano para a saúde de humanos e animais. Para tanto, o requerimento submetido para avaliação da LPMA deve subsidiar a CTNBio com o conjunto de informações necessárias para que os riscos envolvidos sejam identificados e para que as medidas de mitigação dos mesmos sejam estabelecidas.

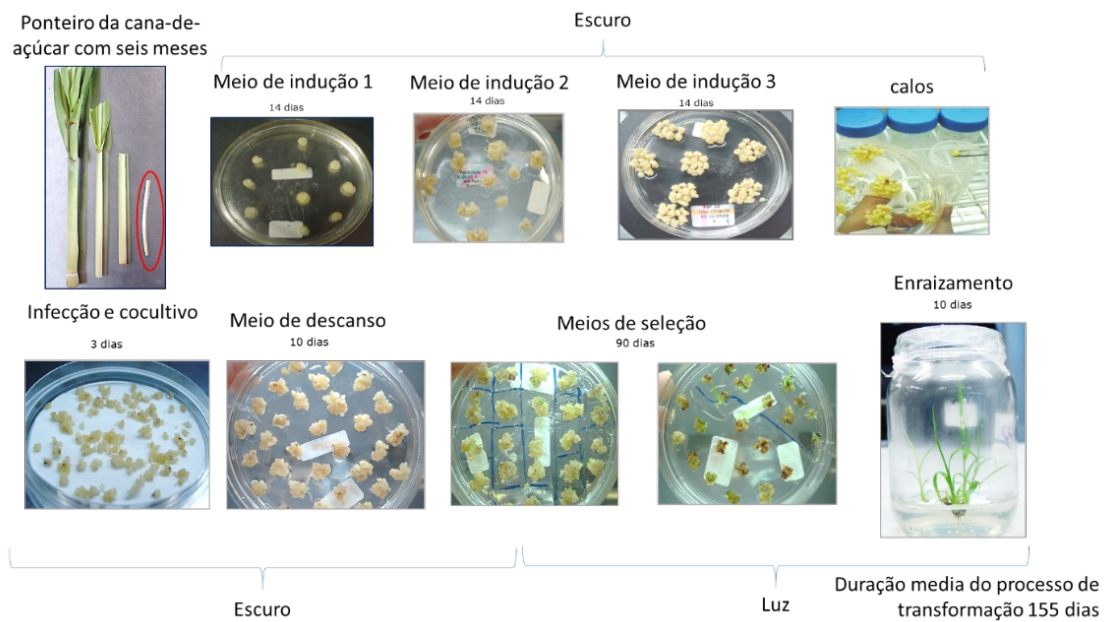
2. MATERIAL E MÉTODOS

As etapas envolvidas no processo de transformação genética de cana utilizando *A. tumefaciens* estão detalhados no esquema na Figura 1. Basicamente, se divide em cinco etapas principais que são: 1) coleta do ponteiros para produção de calos; 2) indução da calogênese e multiplicação dos calos; 3) transformação genética dos calos e co-cultivo com a *A. tumefaciens*; 4) Descanso e seleção do tecido transformado; 5) enraizamento das plântulas e aclimação em substrato. As plântulas de cana-de-açúcar recuperadas a partir da seleção *in vitro* (Fig 2A), ao final do processo, após as etapas de seleção em herbicida e enraizamento, e antes de serem aclimatadas em substrato agrícola, foram testadas com tiras de fluxo lateral para a detecção da proteína do gene de seleção *bar* (Fig 2B). Plântulas que apresentaram na fita a banda específica para o gene que confere tolerância ao herbicida foram consideradas eventos transgênicos positivos. As plântulas positivas foram então aclimatadas em casa de vegetação com temperatura, luminosidade e umidade relativa controlada (Figura 3) e posteriormente, quando apresentam maior



13º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica - CIIC 2019
30 e 31 de julho de 2019 - Campinas, São Paulo
ISBN: 978-85-7029-149-3

quantidade de tecido foliar, foram avaliadas por métodos de biologia molecular, tais como PCR e qRT-PCR.





13º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica - CIIC 2019
30 e 31 de julho de 2019 - Campinas, São Paulo
ISBN: 978-85-7029-149-3

Figura 1 – Etapas do processo de transformação genética de cana-de-açúcar utilizando *Agrobacterium tumefaciens*.

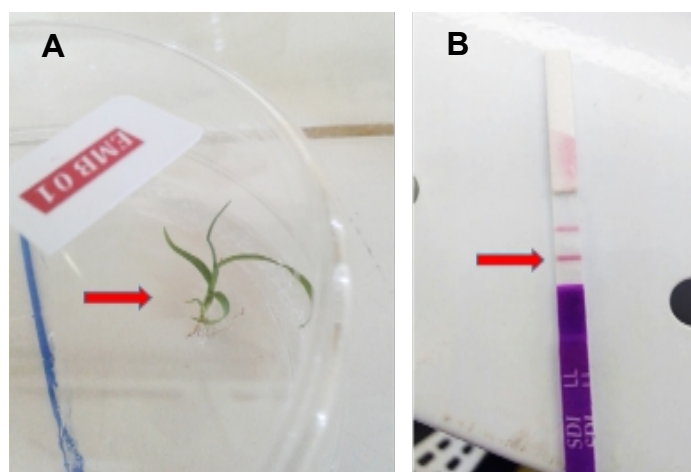


Figura 2 – Obtenção de plântulas geneticamente modificadas de cana-de-açúcar. A) Evento positivo; B) Confirmação da presença da proteína PAT em tiras de fluxo lateral.

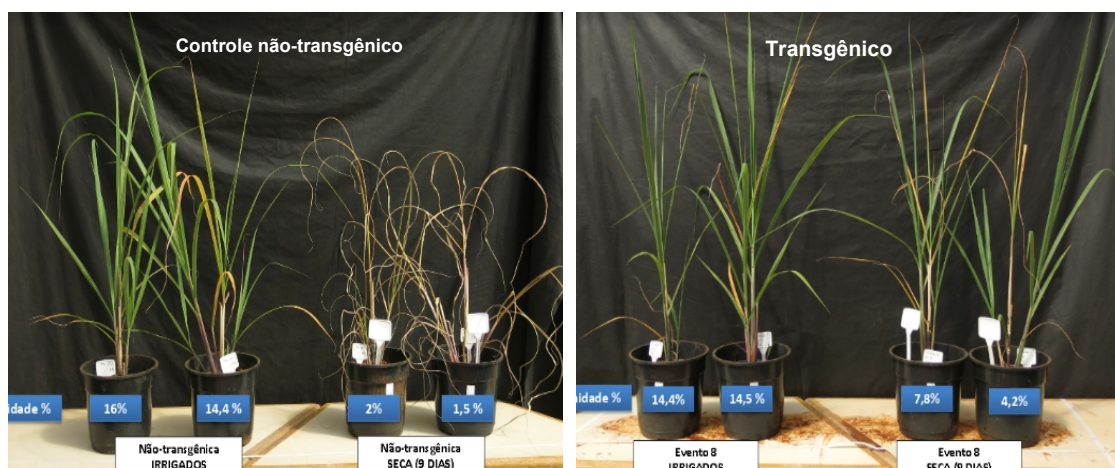
Após o desenvolvimento da primeira geração (T_0), os eventos transgênicos de cana-de-açúcar foram colhidos e os colmos utilizados para multiplicação das mudas que seriam utilizadas na etapa seguinte para avaliação da resposta na condição de estresse hídrico. Esta etapa foi conduzida em



13º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica - CIIC 2019
30 e 31 de julho de 2019 - Campinas, São Paulo
ISBN: 978-85-7029-149-3

vasos contendo solo, irrigados por gotejamento e mantidos em casa-de-vegetação. Durante o período de 9 dias, a irrigação foi cortada nos tratamentos de estresse hídrico para avaliar a resposta dos eventos na ausência de água no solo. Posteriormente, as plantas foram irrigadas para avaliação da recuperação e a partir desses resultados foram selecionados seis eventos por construção para serem multiplicados no campo experimental aprovado para LPMA (Fig. 5). Todas etapas de avaliação no campo seguirão as exigências descritas no norma técnica da CTNBio (RN-06, CTNBio, 2008).

...ar geneticamente modificada em
...es, foi observado que as plantas transformadas possuem um melhor desempenho que as plantas controles, provavelmente devido a





13º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica - CIIC 2019
30 e 31 de julho de 2019 - Campinas, São Paulo
ISBN: 978-85-7029-149-3

expressão gênica dos genes exógenos inseridos nessas plantas (Fig. 4). Adicionalmente, o fenótipo da cultivar SP 80-3280, e suas características agrônômicas, se mantiveram estáveis e não foram afetadas pelo processo de transformação genética, indicando que o efeito dos genes exógenos aparentemente não promoveram nenhuma alteração morfofisiológica indesejada. Ao final do período do tratamento, as plantas controles estavam mortas enquanto que as plantas geneticamente modificadas se mantiveram vivas e recuperaram o desenvolvimento com o retorno da irrigação (Fig. 4).

Figura 4 – Plantas controle e plantas geneticamente modificadas com um dos genes exógenos mantidas em condição normal de umidade no solo: solo irrigado regularmente; e em condição de baixa umidade: sem irrigação por 9 dias consecutivos, simulando o efeito da seca. As porcentagens indicam o nível de umidade medida no solo na ocasião da avaliação. Experimento conduzido em casa-de-vegetação localizada na Embrapa Agroenergia em Brasília-DF.





**13º Congresso Interinstitucional de Iniciação
Científica - CIIC 2019
30 e 31 de julho de 2019 - Campinas, São Paulo
ISBN: 978-85-7029-149-3**

Figura 5 – Fazenda Experimental Sucupira (A) pertencente a Embrapa e localizada em Brasília-DF onde foi instalado o experimento de cana-de-açúcar geneticamente modificada em regime de LPMA para execução a primeira etapa de multiplicação do material propagativo (B).



**13º Congresso Interinstitucional de Iniciação
Científica - CIIC 2019
30 e 31 de julho de 2019 - Campinas, São Paulo
ISBN: 978-85-7029-149-3**

4. CONCLUSÃO

A execução da primeira etapa da LPMA, referente ao campo de multiplicação das plantas GM de cana assim como de seus controles, ocorreu dentro do cronograma planejado. No momento, as plantas de cana GM estão sendo avaliadas para suas características agrônômicas, morfológicas e genéticas (análises de expressão gênica) para a seleção de 3 eventos por construção gênica com o melhor desempenho para os parâmetros descritos acima. Na execução da segunda etapa, os três eventos selecionados serão utilizados para a montagem de um novo experimento no campo, onde as canas GM serão avaliadas em condições de seca e de irrigação contínua .

2. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a EMBRAPA, CNPq e FAPESP pelas bolsas concedidas.

3. REFERÊNCIAS

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira: cana-de-açúcar safra 2018/2019, primeiro levantamento, maio/2018. Brasília, DF: Conab, 2018.

STUPIELLO, J. P. A cana-de-açúcar como matéria-prima. In: PARANHOS, S. B. (Ed.). Cana-de-açúcar: cultivo e utilização. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 187-259

RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 6, de 6 de novembro de 2008. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio).