



RODRIGO DE OLIVEIRA ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DE SISTEMA DE REMOÇÃO DE
GENE MARCADOR DE SELEÇÃO POR
RECOMBINAÇÃO SÍTIO ESPECÍFICA EM
Passiflora edulis spp., EMBRIOGÊNESE
SOMÁTICA E ORGANOGÊNESE DIRETA EM
Saccharum officinarum L.**

LAVRAS - MG

2011

RODRIGO DE OLIVEIRA ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DE SISTEMA DE REMOÇÃO DE GENE MARCADOR
DE SELEÇÃO POR RECOMBINAÇÃO SÍTIO ESPECÍFICA EM
Passiflora edulis spp, EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E
ORGANOGENESE DIRETA EM *Saccharum officinarum* L.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Manoel Teixeira Souza Júnior

LAVRAS - MG

2011

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Almeida, Rodrigo de Oliveira.

Avaliação de sistema de remoção de gene marcador de seleção por recombinação sítio específica em *Passiflora* spp., embriogênese somática e organogênese direta em *Saccharum officinarum* L. / Rodrigo de Oliveira Almeida. – Lavras : UFLA, 2011.

81 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Manoel T. Souza Jr.

Bibliografia.

1. Maracujá. 2. Cana-de-açúcar. 3. Tecnologia marker free. 4. Embriogênese somática. 5. Organogênese direta. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.523

RODRIGO DE OLIVEIRA ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DE SISTEMA DE REMOÇÃO DE GENE MARCADOR
DE SELEÇÃO POR RECOMBINAÇÃO SÍTIO ESPECÍFICA EM
Passiflora edulis spp, EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E
ORGANOGENESE DIRETA EM *Saccharum officinarum* L.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

APROVADO em 25 de fevereiro de 2011.

Dr. Hugo Bruno Correa Molinari

EMBRAPA/CNPAE

Dra. Patrícia do Nascimento Bordallo

EMBRAPA/CNPAT

Dr. Manoel Teixeira Souza Júnior

Orientador

LAVRAS - MG

2011

A Ana Maria, minha mãe, que em sua simplicidade e amor incondicional me incentivou em todos os momentos de minha vida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Lavras, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia vegetal, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

A Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Laboratório Central de Biologia Molecular, onde foram desenvolvidas parte das atividades laboratoriais.

A Embrapa Cenargen, onde foram desenvolvidas as atividades laboratoriais.

Ao prof. Dr. Manoel Teixeira Souza Jr., pela orientação, confiança, apoio e amizade.

Ao pesquisador Dr. Hugo Bruno Correa Molinari, pela amizade, apoio e sugestões.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal pelos conhecimentos transmitidos em suas aulas teóricas e práticas.

Aos analistas da Embrapa Agroenergia, André P. Leão e Bárbara Dias, pela ajuda, apoio técnico e amizade.

Aos colegas e amigos do LCBM - UFLA, Anderson Tadeu, Douglas Barduche, Eula, Fabrício Lélis, Leonardo Zebral, Lilian Fialho e Luiz Gustavo, pela amizade, convivência e apoio técnico.

A todos os colegas da Embrapa Cenargen, pela amizade, convivência e apoio.

A todos os colegas do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, em especial aos meus amigos Anderson, Gabriel, Horllys, José Romário e Luís Gustavo.

Aos meus amigos da graduação, que mesmo distantes me

apoiavam.

A Emi R. Lorenzetti, pelo carinho, compreensão e ajuda em todos os momentos.

Ao meu irmão Eduardo, pela amizade e apoio.

A Hermelindo Jr., pelos bons momentos de descontração e apoio.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meus mais sinceros agradecimentos.

“Quanto mais nos elevamos, menores parecemos aos olhos daqueles que não sabem voar”.

Friedrich Nietzsche

RESUMO GERAL

O presente trabalho visou avaliar o uso do vetor pRCNG na produção de plantas livres de marcadores de seleção, e também aperfeiçoar o protocolo de cultura de tecido para cultivares brasileiras de cana-de-açúcar. No experimento de validação do vetor pRCNG, segmentos de hipocótilo de maracujazeiros foram transformados via *Agrobacterium*. Análise de PCR foi realizada, constatando uma eficiência de transformação foi de 0,33%. Com este resultado, experimentos adicionais são necessários para finalizar a validação deste vetor e da tecnologia marker free. No experimento com cultura de tecido de cana-de-açúcar, foram utilizados explantes foliares das cultivares RB867515, RB855156 e RB72454. O ensaio de embriogênese somática consistiu em avaliar três concentrações de 2,4-D, três tempos de incubação, três subcultivos após 45 dias de indução e três tempos de regeneração. O ensaio de organogênese direta consistiu em avaliar o uso de diferentes concentrações e combinações de ANA, Kin e BAP, e quatro tempos de incubação. Melhores resultados no ensaio de embriogênese somática foram obtidos utilizando 3 mg.L⁻¹ de 2,4-D, 30 dias em meio de indução, dois subcultivos e 30 dias em meio de regeneração para a cultivar RB867515. Melhores resultados no ensaio de organogênese direta foram obtidos com 45 dias de incubação com combinações de ANA e Kin para a cultivar RB855156, independente de suas concentrações.

Palavras-chave: Maracujá. Cana-de-açúcar. Recombinação sítio-específico. NPTII.

GENERAL ABSTRACT

The current study was aimed to achieve two main objectives: to validate the use of the pRCNG vector in the production of marker free genetic modified (GM) passion fruit; and to evaluate the response of three Brazilian sugarcane cultivars to the induction of embryogenesis and organogenesis. In the experiments for pRCNG validation, hypocotyls segments collected from passion fruit plantlets were submitted to transformation by three different *Agrobacterium* strains. Problems with long delay in plant regeneration as well as with the selection medium led to a very small transformation efficiency, what jeopardized the evaluation of the efficiency of removal of the marker gene by site-specific recombination. In the experiments on embryogenesis and organogenesis, leaf segments from cultivars RB867515, RB855156 and RB72454 were used as initial explants. Three 2,4-D concentration, three incubation times, three subculture after 45 days of induction and three regeneration times were evaluated for embryogenesis induction; while different concentration and combination of NAA, Kin and BAP, and four incubation times were evaluated for direct organogenesis. The highest rates in embryogenesis induction were obtained using three mg.L⁻¹ of 2,4-D, 30 days of incubation on induction medium, two subculture and 30 days of incubation on regeneration medium; while in direct organogenesis the best results were obtained after 45 days of induction with NAA and Kin, independent of concentration.

Keywords: Passion fruit. Sugarcane. Site-specific recombination. NPTII

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
1 Introdução geral	1
CAPÍTULO 2	4
TECNOLOGIA MARKER FREE: RETIRADA DE GENES MARCADORES DE SELEÇÃO NA PRODUÇÃO DE PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS	4
1 Resumo	4
2 Abstract	5
3 Introdução	6
4 Referências	15
CAPÍTULO 3	27
AVALIAÇÃO DE SISTEMA DE REMOÇÃO DE GENE MARCADOR DE SELEÇÃO POR RECOMBINAÇÃO SÍTIO-ESPECÍFICA EM MARACUJÁ AMARELO (<i>Passiflora edulis</i> f. <i>Sims. flavicarpa</i> Deg.)	27
1 Resumo	27
2 Abstract	28
3 Introdução	28
4 Materiais e métodos	30
4.1 Material vegetal	30
4.2 Plasmídeo binário	31
4.3 Cultura de <i>Agrobacterium</i> , infecção e co-cultivo	31
4.4 Seleção de prováveis transformantes	32
5 Resultados e discussões	33
5.1 Seleção de maracujazeiros transformados	33
6 Conclusão	35
7 Agradecimentos	36

8	Referências	36
	CAPÍTULO 4	46
	INDUÇÃO DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E ORGANOGÊNESE DIRETA EM <i>Saccharum officinarum</i> L.	46
1	Resumo	46
2	Abstract	47
3	Introdução	48
4	Materiais e métodos	50
4.1	Material vegetal	50
4.2	Embriogênese somática	50
4.3	Regeneração de brotos por calos embriogênicos	51
4.4	Microscopia eletrônica em calos embriogênicos	51
4.5	Análise histológica em calos embriogênicos	52
4.6	Organogênese direta	52
4.7	Análises estatísticas	53
5	Resultados e discussões	53
5.1	Produção de calos embriogênicos	53
5.2	Regeneração de brotos por calos embriogênicos	54
5.3	Produção de brotos por organogênese direta	56
6	Conclusão	57
7	Agradecimentos	58
8	Referências	58

CAPÍTULO 1

1 Introdução geral

O presente trabalho tem como objetivo validar o uso do vetor pRCNG na produção de plantas geneticamente modificadas livres de gene marcador de seleção e avaliar a resposta de diferentes cultivares de cana-de-açúcar usando protocolo de cultura de tecido para indução de embriogênese somática e organogênese direta.

O vetor pRCNG, desenvolvido por Schaart et al. (2004), contém um sistema induzível de recombinação sítio-específica e um gene marcador de seleção híbrido (*codAnptII*) para realizar tanto seleção positiva quanto negativa das células transformadas.

A cultura escolhida para se trabalhar com esta validação foi o maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. Sims. *flavicarpa* Deg.), o qual já possui um protocolo de cultura de tecido e transformação bem definido (Otoni et al., 2007). Através de eletroporação, o vetor pRCNG foi inserido em três cepas de *Agrobacterium* (AGL0, EHA105 e GV3301), a serem utilizadas no processo de transformação (três tratamentos). Seguintes do hipocótilo de maracujá germinados *in vitro* foram infectados por *Agrobacterium*, co-cultivados por 48 horas, e colocadas em meio de cultura contendo 100 mg.L⁻¹ canamicina e 250 mg.L⁻¹ cefotaxima sob condições ideais de temperatura e fotoperíodo. Ao final do processo de seleção, cinco possíveis transformantes foram regenerados. A extração de DNA foi feita pelo método CTAB e uma PCR foi feita para confirmar a transformação. Dois pares de primers foram utilizados para amplificar o gene GUS e *codAnptII*, presentes na construção. Após a análise molecular, foi confirmado um evento transformante.

O objetivo principal do experimento foi produzir plantas geneticamente modificadas livres de marcadores de seleção. Contudo, não foi concluído devido

ao grande tempo demandado para regeneração dos tecidos no meio de seleção positiva. Não tendo sido possível realizar a indução química no tecido transformado para em seguida fazer uma seleção negativa e avaliar a eficiência da excisão do gene marcador por meio de recombinação sítio-específica.

No que diz respeito à cultura de tecido de cana-de-açúcar, foram utilizadas três cultivares de amplo uso no Brasil (RB867515, RB855156 e RB72454), tanto para os estudos de embriogênese somática quanto de organogênese direta. Segmentos transversais de folhas jovens foram utilizados como explante em ambos os protocolos.

Diferentes concentrações do regulador de crescimento 2,4-D (1, 3 e 7 mg.L^{-1}) foram utilizadas para compor o meio de indução de embriogênese somática. A formação de calos embriogênicos foi registrada em três tempos distintos de incubação (30, 45 e 60 dias). Aos 45 dias, os calos embriogênicos foram individualizados dos explantes e colocados em um novo meio de indução (primeiro subcultivo). Mais dois subcultivos foram realizados a cada 21 dias (três subcultivos no total). Após cada subcultivo, os calos embriogênicos foram colocados em meio de regeneração. Os brotos regenerados provenientes dos calos embriogênicos foram registrados em três diferentes tempos (15, 30 e 45 dias). Os melhores resultados foram obtidos para a cultivar RB867515, utilizando 3 mg.L^{-1} de 2,4-D, incubando por 30 dias em meio de indução, realizando dois subcultivos e incubando por 30 dias em meio de regeneração. Para as cultivares RB855156 e RB72454, melhores resultados foram alcançados utilizando 3 mg.L^{-1} e 45 dias e 7 mg.L^{-1} de 2,4-D e 60 dias de incubação, respectivamente.

Diferentes concentrações e combinações dos reguladores de crescimento Ácido α Naftalenoacético (ANA, 5 – 10 mg.L^{-1}), Cinetina (Kin, 0,5 – 1 mg.L^{-1}) e Benzilaminopurina (BAP, 1 – 2 mg.L^{-1}) foram utilizadas para compor o meio de indução de organogênese direta. A formação de brotos por este processo foi

registrado ao longo de quatro tempos distintos de incubação (30, 45, 60 e 70 dias). Os melhores resultados foram obtidos para a cultivar RB855156, incubando por 45 dias e utilizando os reguladores de crescimento ANA e Kin, independente das concentrações utilizadas.

O objetivo principal deste experimento foi alcançado, conseguindo otimizar o protocolo de embriogênese somática e organogênese direta para determinadas cultivares. Mais estudos devem ser realizados objetivando aperfeiçoar e adaptar um eficiente protocolo para cada cultivar.

CAPÍTULO 2

**(Revisão redigida conforme norma da revista científica Pesquisa
Agropecuária Brasileira - Versão preliminar)**

TECNOLOGIA MARKER FREE: RETIRADA DE GENES MARCADORES DE SELEÇÃO NA PRODUÇÃO DE PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS

1 Resumo

Genes marcadores de seleção são amplamente utilizados no desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas (GM). Estes genes promovem a resistência ou tolerância a um agente seletivo, permitindo às células geneticamente modificadas sobreviverem no meio de seleção. Contudo, após a seleção, os genes marcadores de seleção não são mais necessários e se tornam indesejáveis na planta geneticamente modificada. Devido a questões relacionadas com biossegurança e percepção pública, vários grupos de pesquisa no mundo tem trabalhado no desenvolvimento de diferentes estratégias para a produção de plantas geneticamente modificadas livres de genes marcadores de seleção. Nesta revisão, discutiremos diversas estratégias desenvolvidas e aplicáveis para a produção de plantas GM livres de genes marcadores de seleção.

Palavras-chave: Plantas marker free, biossegurança, recombinação sítio-específico, excisão de genes marcadores de seleção.

MARKER FREE TECHNOLOGY: SELECTABLE MARKER GENES REMOVAL IN GENETICALLY MODIFIED PLANT PRODUCTION

2 Abstract

Selectable marker genes are used in the development of genetically modified plants in order to allow positive selection of the cells where the exogenous DNA was successfully inserted. These genes usually enable resistance or tolerance to a selective agent, permitting the genetically modified cells to survive in the selection medium. Nevertheless, after this selection, these selectable marker genes are no longer necessary and become undesirable in the genetically modified plant. Due to concerns related to biosafety and public perception, many researchers groups around the World have engaged in the development of different strategies to produce marker free transgenic plants. In this review, we discuss several strategies developed and available to produce marker free transgenic plants.

Keywords: Marker free plants, biosafety, site-specific recombination, selectable markers genes excision.

3 Introdução

Para se produzir plantas geneticamente modificadas é imprescindível ter um eficiente sistema de transformação genética e regeneração de planta para a espécie com a qual se trabalha (Birch, 1997). Vários fatores influenciam a eficiência do processo de obtenção de uma planta GM, tais como o processo escolhido para realizar a transformação genética, a idade, o tipo e o genótipo do explante, o meio de cultura, os reguladores de crescimento, as condições de cultivo, a concentração e o tipo do agente de seleção.

Genes marcadores de seleção são de vital importância para o desenvolvimento de plantas GM. As primeiras plantas GM criadas em laboratório nos primeiros anos da década de 1980, assim como as primeiras que chegaram ao mercado na metade da década de 1990, utilizaram quase que exclusivamente genes marcadores de seleção que conferiam resistência a antibiótico ou tolerância a herbicidas (Ramessar et al., 2007). Estes genes codificam uma proteína enzimática específica que confere às células vegetais transformadas resistência ou tolerância ao agente seletivo. A finalidade do marcador de seleção é permitir o desenvolvimento somente das células geneticamente modificadas (Brasileiro e Dusi, 1999). A adição dos agentes de seleção à cultura *in vitro* se faz no início do processo de transformação (Sawahel, 1994), sendo que os principais agentes de seleção utilizados foram antibióticos aminoglicosídicos e herbicidas. Destes, os mais amplamente utilizados são, respectivamente, a canamicina e a fosfinotricina.

A canamicina e outros antibióticos aminoglicosídicos atuam na inibição da tradução (Herrera-Estrella et al., 1983; Bevan et al., 1983), matando a célula. Com o uso do gene *nptII*, proveniente de bactéria *E. coli*, há a produção de neomicina fosfotransferase, a qual inativa estes antibióticos por fosforilação. Outros antibióticos usados como agentes seletivos são: gentamicina, geneticina,

neomicina, paromomicina e higromicina (Wilmink e Dons, 1993).

A fosfinotricina (PPT), um análogo da glutamina, é tóxica à planta e age na glutamina sintetase, uma enzima chave para a assimilação de amônio e para a regulação da assimilação de nitrogênio na planta (Miflin e Lea, 1977; De Block et al., 1987). O gene *bar* (Murakani et al., 1986), que codifica a enzima fosfinotricina-N-acetiltransferase (PAT), foi isolado de *Streptomyces hygroscopicus*. A PAT catalisa a detoxificação pela acetilação do grupamento amino livre contido no PPT, incapacitando assim a sua competição de forma inibitória com a glutamina sintetase. Outros herbicidas usados como agentes seletivos são: glifosato, sulfonilureias, imidazolinonas, oxinils e cianamida.

A necessidade em procurar por sistemas alternativos, que não utilize um gene marcador de seleção ou que elimine esse gene após a seleção da célula transformada, se deve a diversas questões, sendo as principais relacionadas à redução na quantidade e no custo de análises de biossegurança, e à percepção pública, sobretudo na questão transferência horizontal de genes de resistência à antibióticos e transferência vertical de genes de tolerância a herbicidas. A estratégia de se retirar o gene marcador de seleção elimina a necessidade de se realizar análises de biossegurança para esse gene específico, reduzindo assim o custo total de produção de um OGM (Hare e Chua, 2002). Há a possibilidade de transferência destes genes para bactérias da flora intestinal humana ou animal, ou para células de algum organismo que venha a interagir com o OGM, segundo Miki e McHugh (2004). De acordo com Bennett et al. (2004), a transferência do gene de resistência a antibióticos dos alimentos transgênicos para estas bactérias foi demonstrado em laboratório, porém com uma frequência muito baixa.

A transferência de DNA da planta para a microbiota ou células de mamíferos sob condições normais de dieta (Food and Agriculture Organization/World Health Organization, 2000 citado por Darbani et al., 2007, p.83), requer todos os seguintes eventos: (a) remoção do gene do genoma da

planta, na forma linear; (b) proteção desse gene contra degradação por endonucleases, da planta e do trato gastrointestinal dos animais; (c) absorção deste gene; (d) transformação da bactéria ou da célula competente mamífera; (e) inserção do gene no DNA hospedeiro, por evento raro de reparo ou recombinação, em uma unidade capaz de ser transcrita; e (f) estabilização contínua do gene inserido.

A preocupação com o risco de transferência vertical do gene marcador que confere tolerância a herbicida tem a ver com a possibilidade de gerar plantas daninhas com resistência a herbicidas (Dale et al., 2002).

A aplicação de um sistema de transformação sem o uso de genes marcadores é uma das estratégias possíveis para a produção de plantas GM sem gene marcador, porém, esta estratégia acarreta em um longo tempo na realização da triagem, assim como uma alta redução no número de eventos (Birch, 1997; De Vetten et al., 2003; Malnoy et al., 2010). As células transformadas tendem a ter desvantagem competitiva com as células não transformadas e consequentemente não sobrevivem (Mullins et al., 1990).

Isso levou a grupos de pesquisa a se concentrarem em criar tecnologias alternativas, que buscam eliminar o gene marcador de seleção após a seleção *in vitro* e antes da liberação comercial. Diferentes estratégias já foram utilizadas com esse propósito, tais como: co-transformação, deleção do gene marcador por recombinação sítio-específica, uso de marcadores de seleção não baseados em antibióticos ou herbicidas, remoção de genes marcadores do cloroplasto e deleção de genes marcadores de seleção utilizando transposons e recombinação intracromossomal.

Abaixo são apresentadas descrições sucintas das principais estratégias hoje utilizadas para gerar plantas GM sem gene marcador de seleção.

Co-transformação

A produção de plantas livres de marcadores de seleção através da estratégia de co-transformação, seja por agrobactéria ou biobalística, se baseia na utilização de duas construções distintas, uma contendo um gene marcador de seleção, e outro contendo o gene de interesse (Sripriya et al., 2008). No método por biobalística, usam-se dois cassetes para realizar a co-transformação, onde os dois cassetes de expressão são preparados em quantidades distintas e alocados no sistema de bombardeamento. Usando o sistema mediado por agrobactéria, há diferentes possibilidades: (a) usar dois T-DNAs em cepas de agrobactérias distintas, (b) utilizar uma única cepa de agrobactéria, carregando consigo dois plasmídeos binários, e (c) utilizar uma única cepa de agrobactéria, contendo dois T-DNAs em um único plasmídeo binário.

Independente da estratégia de transformação utilizada, o gene marcador de seleção será removido do genoma da planta por meio da recombinação combinada com segregação, que ocorre durante a reprodução sexuada, e com isso selecionando apenas as plantas com o gene de interesse. Contudo, para que isto ocorra, se faz necessário a integração do gene marcador de seleção e do gene de interesse em locus separados.

Estudos avaliando a eficiência da co-transformação indicam que T-DNAs presentes em um único vetor de transformação em uma única cepa de agrobactéria é considerado o método mais eficiente dentro deste sistema (Depicker et al., 1985).

Por algum tempo, esta técnica não era aplicada a plantas de propagação vegetativa. Entretanto, Dutt et al. (2008) aplicaram esta estratégia com algumas modificações para produzir videiras geneticamente transformadas livres de genes marcadores de seleção, sem que fosse necessário a segregação dos genes pela reprodução sexuada. Utilizando a expressão transiente dos genes marcadores de seleção *codA* e *nptII* contidos em um T-DNA, os calos embriogênicos de videira sobrevivem a uma breve fase de seleção positiva (no

qual o gene *nptII* confere resistência à canamicina) e em seguida é realizada a seleção negativa (no qual o gene *codA* converte a 5-FC para a forma tóxica 5-FU). Quando a pressão de seleção é removida, as células conseguem integrar de forma estável o T-DNA que contém o gene de interesse. Logo, esta técnica pode ser adaptada e aplicada em outras culturas de propagação vegetativa (Dutt et al., 2008).

Deleção do gene marcador de seleção por recombinação sítio-específica

Encontrado em alguns bacteriófagos, a recombinação sítio-específica pode retirar segmentos de DNA que se encontram entre sítios-específicos de excisão. O sítio-específico de recombinação é formado por sequências palindrômicas conservadas, no qual flanqueiam o DNA a ser excisado (Kurin et al., 1997 citado por Darbani et al., 2007, p.88). As proteínas integrase e excisionase catalisam o processo de recombinação sítio-específica, ocorrendo assim a remoção ou troca do segmento de DNA (Hartl e Jones, 1998).

Atualmente existem três sistemas de recombinação sítio-específico bem estudados e que estão sendo empregados na produção de plantas GM livres de genes marcadores de seleção: (a) sistema Cre/loxP, na qual o processo de recombinação é originário de bacteriófagos P1 (Sternberg e Hamilton, 1981; Dale e Ow, 1990), em que a enzima Cre reconhece os sítios alvos (loxP); (b) sistema FLP/FRT, proveniente de *Sacharomyces cerevisiae* (Huang et al., 1991), onde a enzima FLP atua nos sítios FRT; e (c) sistema R/RS, que tem sua origem em *Zygosaccharomyces rouxii* (Matsuzaki et al., 1990), onde a enzima recombinase (R) atua no sítios de recombinação (RS).

No sistema de remoção de gene marcador de seleção por recombinação sítio-específica, o gene de interesse é introduzido juntamente com o gene marcador de seleção e o gene da recombinase sob regulação de um promotor induzível (Sugita et al., 2000; Roy et al., 2008; Bai et al., 2008; Zhang et al.,

2009), sendo estes flanqueados por sítios de recombinação. Para melhorar a eficiência de transformação pelo sistema de deleção de gene marcador de seleção, ferramentas adicionais podem ser incorporadas a este sistema, tais como: (a) marcador de seleção negativa (*codA*) – um gene dominante letal (Mullen et al., 1992; Stougaard, 1993; Gleave et al., 1999), (b) marcador de seleção morfológica (*ipt*) – sendo assim um marcador visual (Saelim et al., 2009), (c) sistemas de vetores contendo oncogenes para a proliferação e regeneração das plantas geneticamente modificadas (Kopertekh et al., 2004; López-Noguera et al., 2009).

Outra ferramenta utilizada é a utilização de um gene marcador de seleção negativa, em conjunto com o gene marcador de seleção positiva. O gene *codA*, proveniente da bactéria *Escherichia coli*, é um gene marcador de seleção negativa. É um gene letal dominante que codifica uma enzima que converte o substrato não tóxico 5-fluorocitocina (5-FC) para uma forma tóxica, 5-fluorouracila (5-FU) (Mullen et al., 1992; Stougaard, 1993). Há também o gene *dao1*, que pode ser utilizado como um marcador positivo ou negativo, dependendo do substrato utilizado (Erikson et al., 2004). Com ele é possível aplicar a seleção negativa após a seleção positiva, mudando o agente seletivo no substrato, de D-alanina (ou D-serina) para D-isoleucina (ou D-valina).

Outra estratégia é empregar dois sistemas sítios-específicos de recombinação em um cassete, onde um sistema será empregado na integração da sequência de DNA (gene de interesse e gene marcador de seleção), e o outro empregado para a remoção de sequências que não sejam mais necessárias (gene marcador de seleção) (Srivastava e Ow, 2004; Nanto e Ebinuma, 2008; Srivastava e Gidoni, 2010).

Novas tecnologias como Zinc Finger Nuclease e minicromossomos têm-se mostrado eficiente na inserção de genes em locais específicos no genoma da planta, e estão sendo usados em conjunto com o sistema sítio-específico (Cai et

al., 2009; Srivastava e Gidoni, 2010). Zinc Finger Nucleases são enzimas de restrição sintéticas que podem ser desenhadas especificamente para clivar uma região alvo de um DNA dupla fita, e com isso inserir o DNA de interesse. Os minicromossomos têm tamanho equivalente ao cromossomo B de milho. Realizando algumas modificações nestes minicromossomos, direciona-se a inserção do gene desejado. (Birchler et al., 2010).

Marcadores de seleção não baseados em antibióticos ou herbicidas

Vários grupos de pesquisa vêm relatando o uso de marcadores de seleção alternativos, não proveniente de bactérias. Com este sistema pode-se produzir plantas transformadas sem utilizar os marcadores baseados em resistência a antibióticos ou tolerância a herbicidas, fazendo a seleção positiva com estes marcadores alternativos.

Estes novos marcadores são baseados em diversas estratégias, como o uso de diferentes fontes de carbono, enzimas chaves modificadas ou genes específicos existentes em plantas. A utilização do gene *pmi* permite a produção de fosfomanose isomerase, uma enzima que permite utilizar a manose como fonte de carbono (Patil et al., 2009; Briza et al., 2010; Song et al., 2010). Da mesma forma funciona o gene que expressa a palatinase (Boernke et al., 2001), que converte a palatinose em frutose e glicose, e para o gene que expressa a 2-desoxiglucose 6 fosfatase (Kunze et al., 2001), que degrada a 2-desoxiglucose.

Há também marcadores que se baseiam em genes existentes em plantas. Trabalhando com a enzima acetolactato sintase (ALS), que é alvo de diversos herbicidas, Ogawa et al. (2008) realizaram dois pontos de mutação no gene que sintetiza esta enzima em arroz, levando a uma produção de ALS resistente a herbicida. Outros marcadores baseados em genes de plantas são os genes que codificam as enzimas aspartato kinase (AK) e a dihidrodipicolinato sintase (DHPS). Em substrato contendo altas concentrações de lisina e treonina, estas

enzimas são inibidas (mecanismo de feed-back), levando a um subdesenvolvimento da planta. Algumas bactérias contêm genes similares, produzindo as mesmas enzimas (aspartato kinase e dihidrodipicolinato sintase), porém menos suscetíveis a altas concentrações de lisina e treonina. Usando estes genes similares, plantas transformadas se desenvolvem normalmente no meio contendo estes aminoácidos (Jaiwal et al., 2002).

Remoção de genes marcadores do cloroplasto

Por ter um genoma independente, os cloroplastos e mitocôndrias têm sido um novo alvo para se realizar transformação genética de plantas. Devido à herança materna, cloroplastos e mitocôndrias não são disseminados via pólen, eliminando a preocupação com a biossegurança a respeito de fluxo gênico. Os vetores para transformação de cloroplastos são desenhados com sequências homólogas que flanqueiam ambos os lados do transgene, e usando esta estratégia pode-se superar alguns desafios que são fatores limitantes na transformação nuclear, como silenciamento de genes, efeito de posição, e multi etapas de construção para múltiplos genes (Daniell e Dhingra, 2002; Naqvi et al., 2010).

A recombinação homóloga (Iamtham e Day, 2000), a recombinação sítio-específico (Lutz e Maliga, 2008; Sinagawa-Garcia et al., 2009), e a expressão transiente da recombinase (Lutz et al., 2006), têm grande potencial para serem aplicados na transformação de cloroplastos. Foi demonstrado que na re-transformação, a despeito do alto número de genes do cloroplasto, pode remover todas as cópias do gene marcador de seleção por recombinação homóloga (Kode et al., 2006).

Deleção de genes marcadores de seleção utilizando transposons e recombinação intracromossomal

Transposons são sequências de DNA capazes de deixar a sua posição de

origem no cromossomo e se integrem em um outro local deste cromossomo. Estes são caracterizados como família Ac/Ds, e atualmente são utilizados para remoção de genes marcadores de seleção no processo de transformação genética de plantas e inserção de DNA (Cardon et al., 1993; Zhang et al., 2003; Puchta, 2003; Gidoni et al., 2008). O transposon contém a enzima Ac transposase, que reconhece as sequências Ds no DNA, clivando o DNA nesses pontos e reintegrando-o em um outro local. Foi amplamente estudado por Pierre-Henri et al. (2002), sobre o elemento P na mosca das frutas (*Drosophila melanogaster*).

Para usar este método de eliminação de gene marcador de seleção, há a necessidade de: (a) construir um vetor com o gene de interesse flanqueado pelas sequências Ds, e outro vetor contendo o gene marcador de seleção e o gene Ac. (b) inserir os cassetes por co-transformação, e (c) realizar a segregação dos genes. Entretanto, há alguns inconvenientes quanto ao uso deste sistema, como diferentes taxas de transposição para cada espécie, é um método que demanda muito tempo (devido à etapa de segregação), normalmente se mostra com baixa eficiência, e pode gerar plantas mutantes devido aos vários ciclos de excisão e inserção (Scutt et al.; 2002).

Uma variação do sistema de recombinação sítio-específico é o sistema de recombinação intracromossomal. Entretanto, não há expressão de enzimas recombinase nesse sistema, contendo somente sítios-específicos *aatP* e *attB* (originário de fagos e bactérias, respectivamente), responsáveis pela recombinação intracromossomal. Esta recombinação em plantas é obtida pela inserção do gene marcador de seleção entre duas sequências de *att*, que facilita a excisão espontânea (Zubko et al., 2000). O sítio *att* é rico em A+T, na qual é estimulado a realizar a recombinação (Muller et al., 1999). Este sistema apresenta algumas vantagens como uma única etapa de seleção do material transgênico, não necessita da expressão de uma enzima recombinase, utiliza um sistema de recombinação nuclear natural (presente em plantas), não há a

necessidade de reprodução sexuada, e a eficiência da recombinação de homólogos é diretamente correlacionada com o tamanho das regiões homólogas (Zubko et al., 2000).

Atualmente, alguns trabalhos estão sendo realizados combinando o sistema de recombinação sítio-específico com o sistema de recombinação intracromossomal e transformação de cloroplastos/plastídeos, obtendo assim sistemas mais elaborados (Thomson et al., 2010, Kempe et al., 2010).

4 Referências

BAI, X.; WANG, Q.; CHU, C. Excision of a selective marker in transgenic rice using a novel cre/loxp system controlled by a floral specific promoter. **Transgenic Research**, London, v. 17, p. 1035-1043, 2008.

BENNETT, P.M.; LIVESEY, C.T.; NATHWANI, D.; REEVES, D.S.; SAUNDERS, J.R.; WISE R. An assessment of the risks associated with the use of antibiotic resistance genes in genetically modified plants: report of the working party of the British society for antimicrobial chemotherapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 53, p. 418-431, 2004.

BEVAN, M.W.; FLAVELL, R.B.; CHILTON, M.D. A chimaeric antibiotic-resistance gene as a selectable marker for plant-cell transformation. **Nature**, London, v. 304, p. 184-187, 1983.

BIRCH, R.G. Plant transformation: problems and strategies for practical application. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 297-326, 1997.

BIRCHLER, J.A.; KRISHNASWAMY, L.; GAETA, R.T.; MASONBRINK, R.E.; ZHAO, C.Z. Engineered minichromosomes in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, London, v. 29, p. 135-147, 2010.

BÖERNKE, F.; SONNEWALD, U. Use of palatinase and trehalulase sequences as nutritive markers in transformed cells. **World Intellectual Property Organization**, no. WO/2001/059131, 2001. Disponível em: <<http://www.wipo.int/portal/index.html.en>>. Acesso em: 20 fev. 2011.

BRASILEIRO, A.C.M.; DUSI, D.M.A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação de plantas**. Brasília: Embrapa-SP/Embrapa CNPH, 1999, p. 679-735.

BRIZA, J.; RUZICKOVA, N.; NIEDERMEIEROVA, H.; DUSBASKOVA, J.; VLASAK, J. Phosphomannose isomerase gene for selection in lettuce (*lactuca sativa* L.) transformation. **Acta Biochimica Polonica**, Warszawa, v. 57, p. 63-68, 2010.

CAI, C.Q.; DOYON, Y.; AINLEY, W.M.; MILLER, J.C.; DEKELVER, R.C.; MOEHLE, E.A.; ROCK, J.M.; LEE, Y.L.; GARRISON, R.; SCHULENBERG, L.; BLUE, R.; WORDEN, A.; BAKER, L.; FARAJI, F.; ZHANG, L.; HOLMES, M.C.; REBAR, R.J.; COLLINGWOOD, T.N.; WILSON, B.R.; GREGORY, P.D.; URNOV, F.D.; PETOLINO, J.F. Target transgene integration in plant cells using designed zinc finger nucleases. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 69, p. 699-709, 2009.

CARDON, G.H.; FREY, M.; SAEDLER, H.; GIERL, A. Definition and characterization of an artificial en-based spm-based transposon tagging system in transgenic tobacco. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 23, p. 157-178, 1993.

DALE, E.C.; OW, D.W. Intramolecular and intermolecular site-specific recombination in plant-cells mediated by bacteriophage-p1 recombinase. **Gene**, Amsterdam, v. 91, p. 79-85, 1990.

DALE, P.J.; CLARKE, B.; FONTES, E.M.G. Potential for the environmental impact of transgenic crops. **Nature Biotechnology**, New York, v. 20, p. 567-574, 2002.

DANIELL, H.; DHINGRA, A. Multigene engineering: dawn of an exciting new era in biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 13, p. 136-141, 2002.

DARBANI, B.; EIMANIFAR, A.; STEWART, C.N.; CAMARGO, W.N. Methods to produce marker-free transgenic plants. **Biotechnology Journal**, Weinheim v. 2, p. 83-90, 2007.

DE BLOCK, M.; BOTTERMAN, J.; VANDEWIELE, M.; DOCKX, J.; THOEN, C.; GOSSELE, V.; MOVVA, N.R.; THOMPSON, C.; VAN MONTAGU, M.; LEEMANS, J. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. **The Embo Journal**, Oxford, v. 6, p. 2513-2518, 1987.

DE VETTEN, N.; WOLTERS, A.M.; RAEMAKERS, K.; VAN DER MEER, I.;

TER STEGE, R.; HEERES, E.; HEERES, P.; VISSER, R. A transformation method for obtaining marker-free plants of a cross-pollinating and vegetatively propagated crop. **Nature Biotechnology**, New York, v. 21, p. 439-442, 2003.

DEPICKER, A.; HERMAN, L.; JACOBS, A.; SCHELL, J.; VAN MONTAGU, M. Frequencies of simultaneous transformation with different T-DNAs and their relevance to the *Agrobacterium* plant-cell interaction. **Molecular and General Genetics**, Heidelberg, v. 201, p. 477-484, 1985.

DUTT, M.; LI, Z.T.; DHEKNEY, S.A.; GRAY, D.J. A co-transformation system to produce transgenic grapevines free of marker genes. **Plant Science Letters**, Amsterdam, v. 175, p. 423-430, 2008.

ERIKSON, O.; HERTZBERG, M.; NASHOLM, T. A conditional marker gene allowing both positive and negative selection in plants. **Nature Biotechnology**, New York, v. 22, p. 455-458, 2004.

GIDONI, D.; SRIVASTAVA, V.; CARMI, N. Site-specific excisional recombination strategies for elimination of undesirable transgenes from crop plants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Mariland, v. 44, p. 457-467, 2008.

GLEAVE, A.P.; MITRA, D.S.; MUDGE, S.R.; MORRIS, B.A.M. Selectable marker-free transgenic plants without sexual crossing: transient expression of cre recombinase and use of a conditional lethal dominant gene. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 40, p. 223-235, 1999.

HARE, P.D.; CHUA, N.H. Excision of selectable marker genes from transgenic

plants. **Nature Biotechnology**, New York, v. 20, p. 575-580, 2002.

HARTL, D.L.; JONES, E.W. **Genetics: principles and analysis** (4th edn)., Jones and Bartlett, p. 330-359, London, 1998.

HERRERA-ESTRELLA, L.; DE BLOCK, M.; MESSENS, E.; HERNALSTEENS, J.P.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. Chimeric genes as dominant selectable markers in plant-cells. **The Embo Journal**, Oxford, v. 2, p. 987-995, 1983.

HUANG, L.C.; WOOD, E.A.; COX, M.M. A bacterial model system for chromosomal targeting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 19, p. 443-448, 1991.

IAMTHAM, S.; DAY, A. Removal of antibiotic resistance genes from transgenic tobacco plastids. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, p. 1172-1176, 2000.

JAIWAL, P.K.; SAHOO, L.; SINGH, N.D.; SINGH, R.P. Strategies to deal with the concern about marker genes in transgenic plants: Some environment-friendly approaches. **Current Science**, Bangalore, v. 83, p. 128-136, 2002.

KEMPE, K.; RUBTSOVA, M.; BERGER, C.; KUMLEHN, J.; SCHOLLMEIER, C.; GILS, M. Transgene excision from wheat chromosomes by phage phic31 integrase. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 72, p. 673-687, 2010.

KODE, V.; MUDD, E.A.; IAMTHAM, S.; DAY, A. Isolation of precise plastid

deletion mutants by homology-based excision: a resource for site-directed mutagenesis, multi-gene changes and high-throughput plastid transformation. **The Plant Journal**, Oxford, v. 46, p. 901-909, 2006.

KOPERTEKH, L.; JUTTNER, G.; SCHIEMANN, J. Site-specific recombination induced in transgenic plants by PVX virus vector expressing bacteriophage p1 recombinase. **Plant Science Letters**, Amsterdam, v. 166, p. 485-492, 2004.

KUNZE, I.; EBNETH, M.; HEIM, U.; GEIGER, M.; SONNEWALD, U.; HERBERS, K. 2-deoxyglucose resistance: a novel selection marker for plant transformation. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 7, p. 221-227, 2001.

LOPEZ-NOGUERA, S.; PETRI, C.; BURGOS, L. Combining a regeneration-promoting *ipt* gene and site-specific recombination allows a more efficient apricot transformation and the elimination of marker genes. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 28, p. 1781-1790, 2009.

LUTZ, K.A.; BOSACCHI, M.H.; MALIGA, P. Plastid marker-gene excision by transiently expressed cre recombinase. **The Plant Journal**, Oxford, v. 45, p. 447-456, 2006.

LUTZ, K.A.; MALIGA, P. Plastid genomes in a regenerating tobacco shoot derive from a small number of copies selected through a stochastic process. **The Plant Journal**, Oxford, v. 56, p. 975-983, 2008.

MALNOY, M.; BORESZA-WYSOCKA, E.E.; NORELLI, J.L.; FLAISHMAN, M.A.; GIDONI, D.; ALDWINCKLE, H.S. Genetic

transformation of apple (*Malus x domestica*) without use of a selectable marker gene. **Tree Genetics and Genomics**, Heidelberg, v.6, p.423-433, 2010.

MATSUZAKI, H.; NAKAJIMA, R.; NISHIYAMA, J.; ARAKI, H.; OSHIMA, Y. Chromosome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* by using a site-specific recombination system of a yeast plasmid. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 172, p. 610-618, 1990.

MIFLIN, B.J.; LEA, P.J. Amino-acid metabolism. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 28, p. 299-329, 1977.

MIKI, B.; MCHUGH, S. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 107, p. 193-232, 2004.

MULLEN, C.A.; KILSTRUP, M.; BLEASE, R.M. Transfer of the bacterial gene for cytosine deaminase to mammalian cells confers lethal sensitivity to 5-fluorocytosine: a negative selection system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Stanford, v. 89, p. 33-37, 1992.

MULLER, A.E.; KAMISUGI, Y.; GRUNEBERG, R.; NIEDENHOF, I.; HOROLD, R.J.; MEYER, P. Palindromic sequences and a plus t-rich dna elements promote illegitimate recombination in *Nicotiana tabacum*. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 291, p. 29-46, 1999.

MULLINS, M.G.; TANG, F.C; FACCIOTTI, D. *Agrobacterium* mediated genetic transformation of grapevines. Transgenic plants of *Vitis rupestris*

Scheele and buds of *Vitis vinifera* L.. **Nature Biotechnology**, New York, v. 8, p. 1041–1045, 1990.

MURAKAMI, T.; ANZAI, H.; IMAI, S.; SATOH, A.; NAGAOKA, D.; THOMPSON, C.J. The bialaphos biosynthetic genes of *Streptomyces hygroscopicus*: molecular cloning and characterization of the gene cluster. **Molecular and General Genetics**, Heidelberg, v. 205, p. 42-50, 1986.

NANTO, K.; EBINUMA, H. Marker-free site-specific integration plants. **Transgenic Research**, London, v. 17, p. 337-344, 2008.

NAQVI, S.; FARRE, G.; SANAHUJA, G.; CAPELL, T.; ZHU, C.F.; CHRISTOU, P. When more is better: multigene engineering in plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 15, p. 48-56, 2010.

OGAWA, T.; KAWAHIGASHI, H.; TOKI, S.; HANDA, H. Efficient transformation of wheat by using a mutated rice acetolactate synthase gene as a selectable marker. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, p. 1325-1331, 2008.

PATIL, G.; DEOKAR, A.; JAIN, P.K.; THENGANE, R.J.; SRINIVASAN, R. Development of a phosphomannose isomerase-based *Agrobacterium*-mediated transformation system for chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 28, p. 1669-1676, 2009.

PIERRE-HENRI, G.; JEAN-PIERRE, H.; JACQUES, A. (Eds). **Gene avatars: the neo-darwinian theory of evolution**. Kluwer Academy, New York, p. 174-175, 2002.

PUCHTA, H. Towards the ideal gmp: homologous recombination and marker gene excision. **Journal of Plant Physiology**, Kobenhavn, v. 160, p. 743-754, 2003.

RAMESSAR, K.; PEREMARTI, A.; GÓMEZ-GALERA, S.; NAQVI, S.; MORALEJO, M.; MUÑOZ, P.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. Biosafety and risk assessment framework for selectable marker genes in transgenic crop plants: a case of the science not supporting the politics. **Transgenic Research**, London, v. 16, p. 261-280, 2007.

ROY, S.D.; SAXENA, M.; BHOMKAR, P.S.; POOGGIN, M.; HOHN, T.; BHALLA-SARIN, T. Generation of marker free salt tolerant transgenic plants of *Arabidopsis thaliana* using the *gly i* gene and *cre* gene under inducible promoters. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 95, p. 1-11, 2008.

SAELIM, L.; PHANSIRI, S.; SUKSANGPANOMRUNG, M.; NETRPHAN, S.; NARANGAJAVANA, J. Evaluation of a morphological marker selection and excision system to generate marker-free transgenic cassava plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 28, p. 445-455, 2009.

SAWAHEL, W.A. Transgenic plants: performance, release and containment. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Amsterdam, v. 10, p. 139-144, 1994.

SCUTT, C.P.; ZUBKO, E.; MEYER, P. Techniques for the removal of marker genes from transgenic plants. **Biochimie**, Amsterdam, v. 84, p. 1119-1126, 2002.

SINAGAWA-GARCIA, S.R.; TUNGSUCHAT-HUANG, T.; PAREDES-LOPEZ, O.; MALIGA, P. Next generation synthetic vectors for transformation of the plastid genome of higher plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 70, p. 487-498, 2009.

SONG, G.Q.; SINK, K.C.; MA, Y.M.; HERLACHE, T.; HANCOCK, J.F.; LOESCHER, W.H. A novel mannose-based selection system for plant transformation using celery mannose-6-phosphate reductase gene. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 29, p. 163-172, 2010.

SRIPRIYA, R.; RAGHUPATHY, V.; VELUTHAMBI, K. Generation of selectable marker-free sheath blight resistant transgenic rice plants by efficient co-transformation of a cointegrate vector T-DNA and a binary vector D-DNA in one *Agrobacterium tumefaciens* strain. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, p. 1635-1644, 2008.

SRIVASTAVA, V.; GIDONI, D. Site-specific gene integration technologies for crop improvement. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Mariland, v. 46, p. 219-232, 2010.

SRIVASTAVA, V.; OW, D.W. Marker-free site-specific gene integration in plants. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 22, p. 627-629, 2004.

STERNBERG, N.; HAMILTON D. Bacteriophage-p1 site-specific recombination: 1. recombination between loxp sites. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 150, p. 467-486, 1981.

STOUGAARD, J. Substrate-dependent negative selection in plants using a bacterial cytosine deaminase gene. **The Plant Journal**, Oxford, v. 3, p. 755-761, 1993.

SUGITA, K.; KASAHARAQ, T.; MATSUNAGA, E.; EBINUMA, H. A transformation vector for the production of marker-free transgenic plants containing a single copy transgene at high frequency. **The Plant Journal**, Oxford, v. 22, p. 461-469, 2000.

THOMSON, J.G.; CHAN, R.; THILMONY, R.; YAU, Y.Y.; OW, D.W. Phic31 recombination system demonstrates heritable germinal transmission of site-specific excision from the *Arabidopsis* genome. **BMC Biotechnology**, London, v.10, n.17, 2010.

WILMINK, A.; DONS, J.J.M. Selective agents and marker genes for use in transformation of monocotyledonous plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 11, p. 165-185, 1993.

ZHANG, S.; RAINA, S.; LI, H.; LI, J.; DEC, E.; MA, H.; HUANG, H.; FEDOROFF, N.V. Resources for targeted insertional and deletional mutagenesis in *Arabidopsis*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 53, p. 133-150, 2003.

ZHANG, Y.; LIU, H.; LI, B.; ZHANG, J.T.; LI, Y.; ZHANG, H. Generation of selectable marker-free transgenic tomato resistant to drought, cold and oxidative stress using the Cre/Loxp dna excision system. **Transgenic Research**, London, v. 18, p. 607-619, 2009.

ZUBKO, E.; SCUTT, C.; MEYER, P. Intrachromosomal recombination between

atp regions as a tool to remove selectable marker genes from tobacco transgenes. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, p. 442-445, 2000.

CAPÍTULO 3

(Artigo redigido conforme norma da revista científica Pesquisa Agropecuária Brasileira - Versão preliminar)

AVALIAÇÃO DE SISTEMA DE REMOÇÃO DE GENE MARCADOR DE SELEÇÃO POR RECOMBINAÇÃO SÍTIO-ESPECÍFICA EM MARACUJÁ AMARELO (*Passiflora edulis* f. *Sims. flavicarpa* Deg.)

1 Resumo

O uso de genes marcadores de seleção são amplamente utilizados no desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas (GM). Entretanto, os genes marcadores de seleção não são mais necessários após etapa de seleção e se tornam indesejáveis na planta geneticamente modificada. Devido a questões relacionadas à percepção pública e biossegurança, diferentes estratégias foram desenvolvidas visando a produção de plantas geneticamente modificadas livres de genes marcadores de seleção. Há também a questão financeira, pois a presença do gene marcador de seleção aumenta o custo final do processo de desenvolvimento. Neste trabalho relatamos a transformação genética de maracujazeiro visando à obtenção de plantas transgênicas livres de gene marcador de seleção, usando o sistema de recombinação sítio-específico induzível e um gene marcador de seleção bifuncional. Após realizar a seleção positiva e subsequentemente a seleção negativa dos tecidos transformados, plantas geneticamente modificadas livres de genes marcadores de seleção podem ser obtidas.

Palavras-chave: Plantas marker free, maracujá, seleção positiva, seleção negativa.

**EVALUATION OF SELECTABLE MARKER GENE REMOVAL
SYSTEM BY SITE-SPECIFIC RECOMBINATION IN YELLOW
PASSION FRUIT (*Passiflora edulis* f. *Sims. flavicarpa* Deg.)**

2 Abstract

Due to public concerns about the transgenic plants and the environmental safety, new technologies to produce a genetically modified plant without selectable markers were developed. Here we report the passion fruit genetic transformation intending to obtain marker free transgenic plants, using a inducible site-specific recombination system and a bifunctional selectable marker gene. After to perform positive selection and subsequently negative selection, marker free transgenic plant can be obtained.

Keywords: Marker free plants, passion fruit, positive selection, negative selection.

3 Introdução

Maracujá é o nome geral dado ao fruto das cerca de 600 espécies tropicais e subtropicais do gênero *Passiflora* (Passifloraceae) (Salomão e Andrade, 1987). Este gênero, cujo centro de origem é o Brasil, está distribuído de forma bem ampla por todo continente americano, ocorrendo em maior número de espécies na América do Sul e Central. O Centro-Oeste brasileiro é o principal centro de diversidade genética desta cultura (Lima e Cunha, 2004).

O maracujá é economicamente importante principalmente devido ao seu

caráter alimentício, porém essa importância é ampliada pelas suas propriedades farmacológicas, ornamentais e decorativas, que são atrativas a outros setores da agroindústria além do alimentício (Souza e Meletti, 1997; Meletti et al., 2005). O maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. Sims. *flavicarpa* Deg.) e o roxo (*Passiflora edulis* Sims) são as espécies mais cultivadas no Brasil. Cultivado em quase todo território nacional, o maracujazeiro amarelo é usado em 90% dos plantios convencionais (Meletti et al., 2001), sendo que os estados da Bahia, Espírito Santo, Pará, Minas Gerais e Sergipe são os principais produtores nacionais (Agrianual, 2008).

As várias doenças que afetam a cultura e a inexistência de cultivares resistentes despontam como as causas mais significativas da estagnação da área cultivada (Meletti et al., 2005), e no caso específico dos maracujazeiros, uma alternativa de transferência de genes de resistência a doenças se encontra na transformação genética de plantas (Zerbini et al., 2008), promovendo uma nova expectativa para a agroindústria do maracujá. Contudo, há no Brasil e no mundo, uma grande discussão sobre a segurança dos alimentos geneticamente modificados (GM). Um dos principais pontos dessa discussão é o uso de genes resistentes a antibióticos e herbicidas como genes marcadores de seleção, e as possíveis consequências advindas da transferência horizontal e vertical, respectivamente, desse tipo de genes. Há também a questão financeira, haja vista que a presença do gene marcador demanda estudos de biossegurança também deste gene, além dos estudos já demandados para o gene de interesse, aumentando substancialmente o custo final do processo de desenvolvimento e liberação comercial do evento GM (Hare e Chua, 2002).

Isso levou grupos de pesquisa a se concentrarem em criar novas tecnologias que permitisse a geração de plantas GM livres de genes marcadores de seleção. Dentre as diferentes estratégias utilizadas destacam-se a co-transformação (Depicker et al., 1985; Sripriya et al., 2008), a deleção do gene

marcador por recombinação sítio-específica pós-seleção do transformante (Bai et al., 2008; Zhang et al., 2009), o uso de marcadores de seleção não baseados em antibióticos ou herbicidas (Kunze et al., 2001; Song et al., 2010), a remoção de genes marcadores do cloroplasto (Daniell e Dhingra, 2002; Naqvi et al., 2010) e a deleção de genes marcadores de seleção utilizando transposons e recombinação intracromossomal.(Scutt et al.; 2002; Puchta, 2003; Gidoni et al., 2008).

O objetivo deste estudo foi a validação de estratégia de deleção de gene marcador por recombinação sítio-específica em *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* mediante emprego do vetor pRCNG (Schaart et al., 2004) para a transformação genética . Este vetor apresenta dois sítios de recombinação Rs, uma sequência modificada do gene recombinase, gene GUS, um gene marcador de seleção híbrido (fusão dos genes *codA* e *nptII*), enhancer *AMV* (proveniente do Vírus do Mosaico da Alfafa) e gene terminador da nopalina sintase (*nos*). O seu uso promete, após aplicação sucessiva de seleção positiva e negativa, possibilitar a eliminação do gene marcador de seleção da planta GM.

4 Materiais e métodos

4.1 Material vegetal

Hipocótilos de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) obtidos de plântulas germinadas *in vitro* foram utilizados como explantes neste estudo. As sementes tiveram seus tegumentos removidos mediante emprego de uma mini-morsa, com conseqüente desinfecção em etanol 70% por 1 minuto, seguida por hipoclorito de sódio 2,5% por 15 minutos. Após a desinfestação, as sementes foram lavadas três vezes com água estéril e acondicionadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio MS sólido (Murashige e Skoog, 1962),

suplementado com 100 mg.L⁻¹ de myo-inositol, 1 mg.L⁻¹ de ácido nicotínico, 1 mg.L⁻¹ de piridoxina e 10 mg.L⁻¹ de tiamina. O pH do meio foi ajustado para 5.7 ± 0.1 antes de autoclavar. As sementes em meio de cultura foram incubadas a 26 ± 1°C, no escuro, por 4 – 5 semanas, em câmara de crescimento.

4.2 Plasmídeo binário

O plasmídeo pRCNG, desenvolvido por Schaart et al.(2004), foi obtido por meio de acordo de transferência de material estabelecido com o Plant Research International (PRI) da Wageningen University e Research Centers (WUR), e contém o gene da β-glucuronidase (GUS), uma sequência modificada do gene recombinase, um gene marcador de seleção híbrido (fusão dos genes *codA* e *nptII*), gene terminador da nopalina sintase (*tnos*), enhancer *AMV* (proveniente do Vírus do Mosaico da Alfafa), e sítios de recombinação (Rs) (Figura 1).

4.3 Cultura de *Agrobacterium*, infecção e co-cultivo

As cepas de agrobactéria AGL0, EHA105 e GV3301, transformadas com o vetor pRCNG, foram utilizadas nesse estudo. Uma única colônia de cada cepa foi ressuspensa em 5 mL de meio LB (Luria-Bertani broth) contendo 100 mg.L⁻¹ de canamicina e incubada a 28°C, no escuro, sob agitação de 200 rpm, por 8 horas. Após este procedimento, 500 µL da cultura foram transferidos para 25 mL de meio LB contendo 100 mg.L⁻¹ de canamicina e incubada a 28°C, sob agitação de 200 rpm até atingir a OD₆₀₀= 0,5. As culturas foram centrifugadas a 5.000 rpm a 28°C, o sobrenadante foi descartado e os pellets foram ressuspensidos em meio MS líquido (pH 5,7) contendo 200 µM de acetoseringona, alcançando OD₆₀₀= 0,6.

Em condições assépticas, os hipocótilos foram cortados em segmentos de 1 cm de comprimento, colocados em contato com a solução

bacteriana (infecção do tecido) e co-cultivados em meio MS sólido, suplementado com 200 μ M de acetoseringona, incubados a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro, por 48 horas.

4.4 Seleção de prováveis transformantes

Após o co-cultivo, os explantes foram transferidos para novo meio MS sólido suplementado com 250 mg.L⁻¹ de cefotaxima, 100 mg.L⁻¹ de canamicina e 1 mg.L⁻¹ de BAP (Benzilaminopurina), e incubados a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, sob fotoperíodo de 16 h. A cada 15 dias, os explantes foram subcultivados para novos meios de mesma composição. Após 10 semanas, os explantes sobreviventes foram colocados em meio MS sólido suplementado com 100 mg.L⁻¹ de myo-inositol, 1 mg.L⁻¹ de ácido nicotínico, 1 mg.L⁻¹ de piridoxina e 10 mg.L⁻¹ de tiamina e, alternativamente a cada subcultivo, com 2,15 mg.L⁻¹ de cinetina (6-furfurilaminopurina) e 0,88 mg.L⁻¹ de AIA (ácido indolacético).

Amostras de DNA foram isoladas de folhas jovens das plântulas regeneradas *in vitro*, de acordo com o método CTAB (Doyle e Doyle, 1987). Para a análise de PCR das prováveis plantas transformadas, dois pares de primers foram usados. Os primers GUS F (5'-CTGTAGAAACCCCAACCCGTG-3') e GUS R (5'-CATTACGCTGCGATGGATCCC-3') foram utilizados para amplificar um fragmento de 445 pb do gene GUS, e assim detectar a presença do T-DNA. Os primers CodNptII F (5'-AAGGTGATTGCCAGCACACA-3') e CodNptII R (5'-TACGTGCTCGC-TCGATGCGA-3') foram utilizados para amplificar 274 pb do gene marcador híbrido (Schaart et al., 2004). Como controle, amostras de DNA de maracujazeiros não transformados foram incluídas na análise. As condições utilizadas na PCR foram: 95°C / 2 minutos, 1 ciclo, seguido de 35 ciclos de 95°C / 20 segundos, 60°C / 20 segundos e 72°C / 40 segundos, e um ciclo de extensão final a 72°C / 5

minutos.

O experimento consistiu de três tratamentos (cepas AGL0, EHA105 e GV3301, transformadas com o vetor pRCNG), sendo 100 explantes por tratamento. O tratamento controle consistiu de 30 explantes. Foram realizadas três repetições biológicas deste experimento.

Os experimentos foram conduzidos em blocos inteiramente casualizados no laboratório de genética molecular da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia entre maio de 2010 e fevereiro de 2011.

5 Resultados e discussões

5.1 Seleção de maracujazeiros transformados

Antibióticos aminoglicosídicos, como a canamicina, inibem a tradução de proteínas (Bevan et al., 1983), sendo usados como um agente de seleção positiva. Usando o gene *nptII* como gene marcador de seleção, somente as células transformadas conseguem sobreviver e se desenvolver em meio seletivo contendo esse tipo de antibióticos.

Devido à presença de um gene marcador de seleção híbrido (fusão dos genes *codA* e *nptII*), o antibiótico canamicina foi utilizado nesse estudo para seleção positiva de transformantes. A concentração de canamicina utilizada inicialmente para seleção foi a recomendada por Otoni et al. (2007), isto é, de 200 mg.L⁻¹. Entretanto, no presente estudo essa concentração levou ao aparecimento de um alto número de explantes necrosados, os quais foram conseqüentemente sendo eliminados. O problema com o aparecimento de explantes necrosados foi eliminado quando a concentração de 100 mg.L⁻¹ de canamicina, como relatado por Trevisan et al. (2006), foi utilizada. Ao final, cinco plantas potencialmente modificadas geneticamente foram regeneradas após a seleção positiva com essa concentração de canamicina (Figura 2).

A transformação genética do maracujazeiro via *Agrobacterium* foi relatada anteriormente por Manders et al. (1994) e Trevisan et al. (2006), assim como a introdução de genes via biobalística por Takahashi (2002) e Freitas et al. (2006). Assim como Monteiro (2005), o presente trabalho utilizou o protocolo de organogênese direta de segmentos de hipocótilo de maracujazeiro. A morfogênese *in vitro* pode ser influenciada por diversos fatores, como fonte, tamanho e idade do explante, condições fisiológicas, genótipo e condições ambientais da planta doadora do explante (Vasil e Thorpe, 1994; Becerra et al., 2004). O meio de cultura complementado com citocininas promove organogênese (Biasi et al., 2000), e com auxinas promove a formação de calos e raízes (Dornelas e Vieira, 1994).

A análise de DNA por PCR utilizando dois pares de primers (*GUS* F / *GUS* R e *CodNptII* F / *CodNptII* R) mostrou a presença do gene *GUS* em duas plântulas regeneradas (amostras D e E) e a presença do gene *codAnptII* somente em uma plântula regenerada (amostra D) (Figura 3). Desta forma, a eficiência de transformação foi de 0,33% para o tratamento utilizando a agrobactéria AGL0 (pRCNG). Este cálculo foi feito com base no número de plântulas transformadas (PCR⁺) em relação à quantidade de explantes infectados e co-cultivados (Tabela 1). Essa eficiência mostrou-se bem inferior às eficiências obtidas por Trevisan et al. (2006) e Monteiro et al. (2005), os quais obtiveram 3,3% e 10% respectivamente. Essa baixa eficiência obtida está associada aos problemas enfrentados com as concentrações de canamicina utilizadas e o aparecimento de tecidos necrosados, que acabaram sendo eliminados.

Outro ponto crítico neste estudo foi o tempo de regeneração dos explantes potencialmente transformados. O tempo de regeneração das plantas controle foi de 4 semanas, enquanto os explantes potencialmente transformados iniciaram a regeneração após 12 semanas.

O longo atraso observado na regeneração das plantas potencialmente

transformadas consumiu grande parte do tempo inicialmente planejado para a execução do estudo, impossibilitando a realização da segunda fase deste estudo em tempo hábil para defesa dessa dissertação.

A segunda parte desse estudo consistiria da indução química do gene recombinase presente no vetor pRCNG, o qual excisaria o gene marcador de seleção *codAnptII*, tornando o gene *gus* ativo. Após a indução química, estes explantes seriam colocados em meio de seleção negativa, onde somente as células sem o gene *codAnptII* sobreviveriam e se desenvolveriam, gerando assim plantas GM livres de gene marcador.

6 Conclusão

O T-DNA do plasmídio binário pRCNG foi introduzido com sucesso no genoma do maracujazeiro amarelo; porém com eficiência pelo menos 10 vezes menor que a relatada em outros estudos. Problemas de necrose de tecidos, quando estes foram cultivados em concentrações de canamicina indicadas como ótimas em outros estudos de transformação de maracujá, podem ter sido responsáveis diretos pela baixa eficiência observada. O longo período para a regeneração de plantas potencialmente transformadas, doze semanas após o co-cultivo, também contribuiu para essa baixa eficiência; haja vista que após o período estabelecido para a seleção dos transformantes novos regenerantes continuaram a ser obtidos. Esses transformantes não foram computados para efeito de cálculo de eficiência de transformação. A parte do estudo a indução química do gene recombinase para a retirada do gene híbrido marcador de seleção (*codAnptII*) e com isso produzir plantas geneticamente modificadas livres de genes marcadores de seleção não pôde ser realizada em tempo hábil para a defesa dessa dissertação.

7 Agradecimentos

Agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Agradecemos também ao Dr. Alan Carvalho de Andrade da Embrapa – Cenargen e ao Dr. Luciano Vilela Paiva da Universidade Federal de Lavras, pela disponibilização do laboratório e suporte nas análises moleculares.

8 Referências

AGRIANUAL 2008. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria, 2008.

BAI, X.; WANG, Q.; CHU, C. Excision of a selective marker in transgenic rice using a novel cre/loxP system controlled by a floral specific promoter. **Transgenic Research**, London, v. 17, p. 1035-1043, 2008.

BECERRA, D.C.; FORERO, A.P.; GÓNGORA, G.A. Age and physiological condition of donor plants affect *in vitro* morphogenesis in leaf explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 79, p. 87-90, 2004.

BEVAN, M.W.; FLAVELL, R.B.; CHILTON, M.D. A chimaeric antibiotic-resistance gene as a selectable marker for plant-cell transformation. **Nature**, London, v. 304, p. 184-187, 1983.

BIASI, L.A.; FALCO, M.C.; RODRIGUEZ, A.P.M.; MENDES, B.M.J. Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, p. 661-665, 2000.

DANIELL, H.; DHINGRA, A. Multigene engineering: dawn of an exciting new era in biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 13, p. 136-141, 2002.

DEPICKER, A.; HERMAN, L.; JACOBS, A.; SCHELL, J.; VAN MONTAGU, M. Frequencies of simultaneous transformation with different T-DNAs and their relevance to the *Agrobacterium* plant-cell interaction. **Molecular and General Genetics**, Heidelberg, v. 201, p. 477-484, 1985.

DORNELAS, M.C.; VIEIRA, M.L.C. Tissue culture studies on species of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 36, p. 211-217, 1994.

DOYLE, J.J.T.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Gaithersburg, v. 12, p. 13-15, 1987.

FREITAS, D.S.; COELHO, M.C.F.; SOUZA JR., M.T.; MARQUES, A.; RIBEIRO, M.B. Introduction of the anti-apoptotic baculovirus *p35* gene in passion fruit induces herbicide tolerance, reduced bacterial lesions, but does not inhibit passion fruit woodiness disease progress induced by cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV). **Biotechnology Letters**, Amsterdam, v. 29, p. 79-87, 2006.

GIDONI, D.; SRIVASTAVA, V.; CARMI, N. Site-specific excisional recombination strategies for elimination of undesirable transgenes from crop plants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Mariland, v. 44, p. 457-467, 2008.

HARE, P.D.; CHUA, N.H. Excision of selectable marker genes from transgenic plants. **Nature Biotechnology**, New York, v. 20, p. 575-580, 2002.

KUNZE, I.; EBNETH, M.; HEIM, U.; GEIGER, M.; SONNEWALD, U.; HERBERS, K. 2-deoxyglucose resistance: a novel selection marker for plant transformation. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 7, p. 221-227, 2001.

LIMA, A. DE A.; CUNHA, M.A.P. **Maracujá: Produção e qualidade na Passicultura**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004, 396p.

MANDERS, G.; OTONI, W.C.; D'UTRA VAZ, F.B.; BLACKHALL, N.W.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. Transformation of passionfruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 13, p. 697-702, 1994.

MELETTI, L.M.M.; BRUCKNER, C.H.; PICANÇO, M.C. **Maracujá: Tecnologia de Produção, Pós-colheita, Agroindústria e Mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001, p. 345-386.

MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D.; BERNACCI, L.C.; PASSOS, I.R.S. Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Ed.). **Maracujá germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 55-78.

MONTEIRO, M. **Transformação genética de maracujá amarelo visando resistência a *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflore***. Piracicaba, 2005. 134p.

Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, København, v. 15, p. 473-497, 1962.

OTONI, W.C.; SILVA, M.L.; LIMA, A.B.P.; PINTO, D.L.P.; LANI, E.R.G.; REIS, L.B. Transformação genética de maracujazeiros. In: TORRES, A.C.; DUSI, A.N.; SANTOS, M.D.M. (Ed.). **Transformação genética de plantas via Agrobacterium: Teoria e Prática**. Brasília: Embrapa Cenargen, 2007, p. 125-142.

PUCHTA, H. Towards the ideal gmp: homologous recombination and marker gene excision. **Journal of Plant Physiology**, København, v. 160, p. 743-754, 2003.

NAQVI, S.; FARRE, G.; SANAHUJA, G.; CAPELL, T.; ZHU, C.F.; CHRISTOU, P. When more is better: multigene engineering in plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 15, p. 48-56, 2010.

SALOMÃO, T.A., ANDRADE, V.M.M. Botânica. In: RUGGIERO, C. (Ed.) **Cultura do maracujazeiro**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 1987. p. 20-39.

SCHAART, J.G.; KRENS, F.A.; PELGROM, K.T.B.; MENDES, O.; ROUWENDAL, G.J.A. Effective production of marker-free transgenic strawberry plants using inducible site-specific recombination and a bifunctional selectable marker gene. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 2, p. 233-240,

2004.

SCUTT, C.P.; ZUBKO, E.; MEYER, P. Techniques for the removal of marker genes from transgenic plants. **Biochimie**, Amsterdam, v. 84, p. 1119-1126, 2002.

SONG, G.Q.; SINK, K.C.; MA, Y.M.; HERLACHE, T.; HANCOCK, J.F.; LOESCHER, W.H. A novel mannose-based selection system for plant transformation using celery mannose-6-phosphate reductase gene. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 29, p. 163-172, 2010.

SOUZA, J.S.I. DE; MELETTI, L.M.M. Maracujá, espécies, variedades, cultivo. Piracicaba: **FEALQ**, 1997, v. 3, 179p.

SRIPRIYA, R.; RAGHUPATHY, V.; VELUTHAMBI, K. Generation of selectable marker-free sheath blight resistant transgenic rice plants by efficient co-transformation of a cointegrate vector T-DNA and a binary vector D-DNA in one *Agrobacterium tumefaciens* strain. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, p. 1635-1644, 2008.

TAKAHASHI, E.K. **Transferência do gene atacina A para plantas de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) por biobalística**. Piracicaba, 2002. 137p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

TREVISAN, F.; MENDES, B.M.J.; MACIEL, S.C.; VIEIRA, M.L.C.; MELETTI, L.M.M.; REZENDE, J.A.M. Resistance to Passion fruit woodiness virus in transgenic passionflower expressing the virus coat protein gene. **Plant**

Disease, Saint Paul, v. 90, p. 1026-1030, 2006.

VASIL, I.K.; THORPE, T.A. **Plant Cell and Tissue Culture**. London: Kluwer Academic Publishers, 1994, 312p.

ZHANG, Y.; LIU, H.; LI, B.; ZHANG, J.T.; LI, Y.; ZHANG, H. Generation of selectable marker-free transgenic tomato resistant to drought, cold and oxidative stress using the cre/loxp dna excision system. **Transgenic Research**, London, v. 18, p. 607-619, 2009.

ZERBINI, F.M.; OTONI, W.C.; VIEIRA, M.L.C. Passion fruit. In: KOLE, C.; HALL, T.C. (Ed.). **Compendium of Transgenic Crop Plants**. Transgenic Tropical and Subtropical Fruits and Nuts. Oxford: Blackwell, 2008. v. 5, p. 213-234.

Tabela 1 Três cepas de *Agrobacterium* transformadas com o vetor pRCNG foram usadas na transformação genética de maracujazeiros. A eficiência de transformação foi baseado no número de plântulas transformadas (PCR + para os genes *GUS* e *codAnptII*) em relação à quantidade de explantes infectados e co-cultivados (300 para cada tratamento).

Tratamento	GUS+	CodANptII+	Eficiência de transformação
AGL0 (pRCNG)	1	1	0,33%
EHA105 (pRCNG)	0	0	0%
GV3301 (pRCNG)	1	0	0%

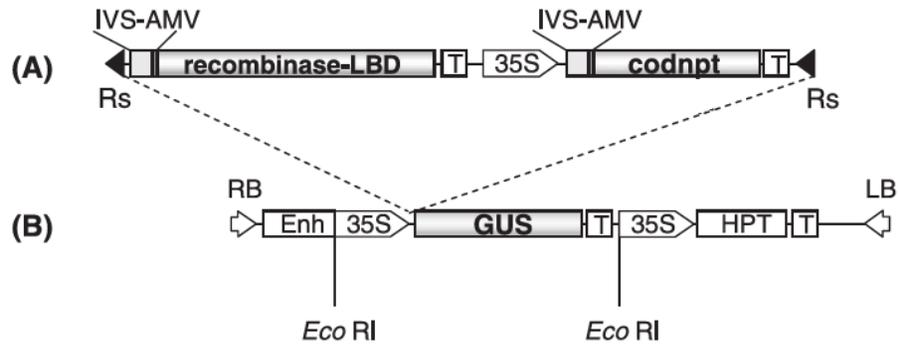


Figura 1 Diagrama do vetor pRCNG (Fonte: Schaart et al., 2004), consistindo do segmento A inserido entre o promotor enhanced CaMV 35S e gene *GUS*, no segmento B. RB, borda direita; LB, borda esquerda; Rs, sítio de recombinação; 35S, promotor CaMV 35S, Enh, enhancer; IVS, intron 5 do gene gbss de batata; AMV, região não traduzível 5' do Vírus do Mosaico da Alfafa; recombinase-LBD, gene recombinase modificado; T, gene terminador *nos* de *Agrobacterium tumefaciens*; HPT, gene de resistência a higromicina; codnpt, gene híbrido para seleção positiva (*nptII*) e negativa (*codA*); *GUS*, gene repórter β -glucuronidase.

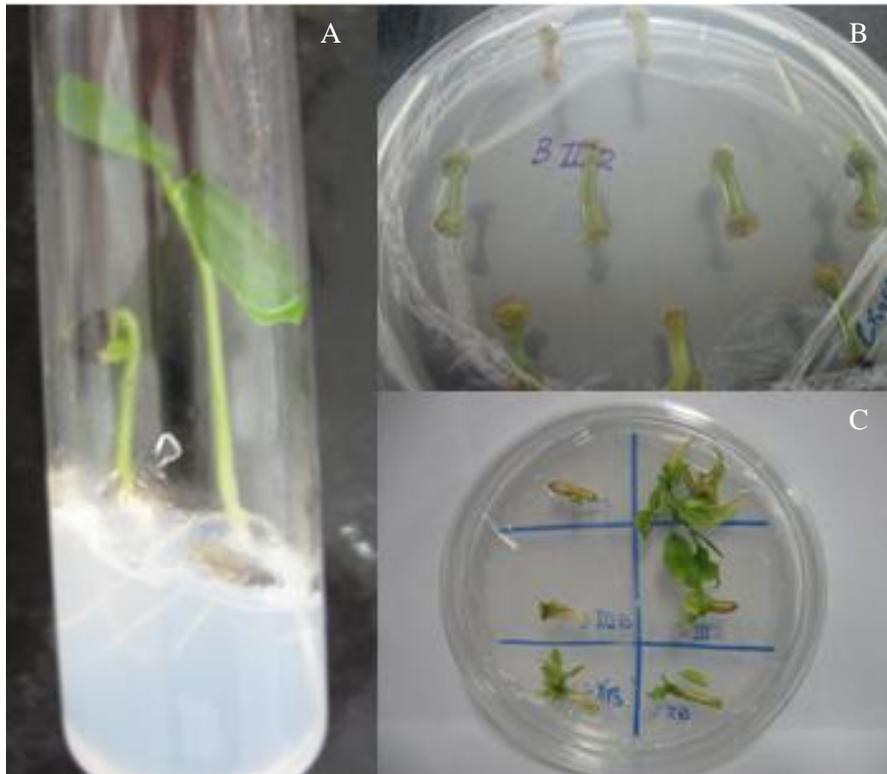


Figura 2 Processo de transformação genética realizado em *Passiflora edulis* f. Sims. *flavicarpa* Deg., utilizando como explante hipocótilos de plântulas *in vitro*. A – Germinação *in vitro* das sementes após a retirada dos tegumentos e desinfestação. B – Hipocótilos medindo 1 cm de comprimento em meio de seleção positiva (100 mg.L^{-1} de canamicina e 250 mg.L^{-1} de cefotaxima) após o processo de infecção e co-cultivo com *Agrobacterium*. C – Regeneração de plântulas em meio de seleção positiva contendo AIA ou cinetina (a cada subcultivo).



Figura 3 Análise molecular de prováveis transformantes. Três cepas de *Agrobacterium* transformadas com o vetor pRCNG foram utilizadas na transformação genética do maracujazeiro. Cinco explantes foram regenerados (A, B, C, D and E). Dois pares de primers de oligonucleotídeos (GUSF/GUSR e CodNptIIF/CodNptIIR) foram usados para amplificar 445 pb do gene *GUS* e 274 pb do gene *codAnptII* na análise de PCR. A, B, C e E – escapes não transgênicos; D – plântula transformada; A e E – Transformação mediada pela *Agrobacterium* GV3301(pRCNG). B, C e D – Transformação mediada pela *Agrobacterium* AGL0(pRCNG). N – Controle negativo (plântula não transformada); M – Marcador de peso molecular (ladder 100 pb).

CAPÍTULO 4

(Artigo redigido conforme norma da revista científica Pesquisa Agropecuária Brasileira - Versão preliminar)

INDUÇÃO DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E ORGANOGÊNESE DIRETA EM *Saccharum officinarum* L.

1 Resumo

Neste estudo foi avaliada a resposta morfogênica das cultivares RB867515, RB855156 e RB72454 à indução de embriogênese somática, com subsequente regeneração de plantas, e à indução de organogênese direta. Segmentos transversais de folhas jovens medindo 2-3 mm de espessura foram cultivados em meio MS sólido contendo diferentes concentrações de 2,4-D para indução de calos embriogênicos e em meio MS sólido contendo combinações de ANA (Ácido α - naftalenoacético), Kin (6-Furfurilaminopurina) e BAP (6-Benzilaminopurina) para indução de organogênese direta. Os melhores resultados na geração de calos embriogênicos foram obtidos usando 3 mg.L⁻¹ de 2,4-D, 30 dias de incubação em meio de indução, dois subcultivos e 30 dias de incubação em meio de regeneração para o cultivar RB867515. Para as cultivares RB855156 e RB72454, os melhores resultados foram obtidos usando 3 mg.L⁻¹ e 45 dias, e 7 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 60 dias de incubação, respectivamente. Os melhores resultados na produção de brotos via organogênese direta foram obtidos durante 45 dias de indução com as combinações de ANA e Kin para a cultivar RB855156, independente de suas concentrações. Estes resultados mostram um eficiente protocolo de embriogênese somática para a cultivar RB867515, obtendo 90% de produção de calos embriogênicos em 30 dias, e um protocolo de organogênese direta para a cultivar RB855156, obtendo 40% de

brotos em 45 dias.

Palavras-chave: *Saccharum officinarum* L., calos embriogênicos, cultura de tecido de cana-de-açúcar, organogênese direta.

SOMATIC EMBRYOGENESIS INDUCTION AND DIRECT ORGANOGENESIS IN *Saccharum officinarum* L.

2 Abstract

In this study, morphogenic response to somatic embryogenesis, regeneration and direct organogenesis for cultivars RB867515, RB855156 and RB72454 were evaluated. Transversal segments of young leaves roll with 2-3mm size were used on solid MS medium supplemented with different concentrations of 2,4-D for embryogenic callus induction and on MS medium supplemented with different combinations of α -Naphthaleneacetic acid (NAA), 6-Furfurylaminopurine (Kin) and Benzylaminopurine (BAP) for direct shoot induction. Better results in the embriogenic calli generation were obtained using 3 mg.L⁻¹ of 2,4-D, 30 days of incubation on induction medium, two subculture and 30 days of incubation on regeneration medium for cultivar RB867515. For cultivars RB855156 and RB72454, better results were obtained using 3 mg.L⁻¹ and 45 days, and 7 mg.L⁻¹ of 2,4-D and 60 days of incubation, respectively. Better results in shoots generation via direct organogenesis were obtained during 45 days of induction with NAA and Kin combination for cultivar RB855156, independently of their concentration. These results show an efficient protocol of

somatic embryogenesis for cultivar RB867515, obtaining 90% of embryogenic calli production in 30 days, and a protocol of direct organogenesis for cultivar RB855156, obtaining 40% of shoots in 45 days.

Keywords: *Saccharum officinarum* L., embryogenic callus, sugarcane tissue culture, callus regeneration, direct shoot organogenesis.

3 Introdução

A cana-de-açúcar é plantada em larga escala comercial nos trópicos e sub-trópicos (Costa-Lima et al., 2001), estando presente em mais de 80 países (Ho e Vasil, 1983). O cultivo da cana-de-açúcar no território brasileiro passou de 7.409.600 ha para 8.091.500 ha em 2010, tendo como principais produtores os Estados de São Paulo (54,35% da produção nacional), Minas Gerais (8%), Paraná (7,5%), Goiás (7,4%) e Alagoas (5,74%) (CONAB, 2010). A produtividade média brasileira é de 82.103 kg/ha, sendo as médias superiores obtidas na região Centro-Sul do Brasil, devido, entre outros fatos, as condições de produção e tecnologia aplicadas (CONAB, 2010).

Da produção total de cana-de-açúcar do Brasil, 46,2% destinaram-se para a produção de açúcar, e o restante para a produção de etanol (CONAB, 2010). Esta agroindústria é responsável por gerar diversos empregos, tendo destaque a nível social (Ribeiro, 2007). É uma cultura muito importante para o setor de indústrias de açúcar e etanol, onde também gera diferentes subprodutos como bagaço e melaço (Stupiello, 1987). O bagaço pode ser utilizado para gerar eletricidade e o uso da palha pode aumentar a quantidade de energia gerada por esse bagaço, aumentando assim a importância desta cultura e seu papel no desenvolvimento sustentável (Saciloto, 2003; Felix, 2006). Após a introdução do

etanol como combustível alternativo ao petróleo, o Brasil aumentou substancialmente a produção de cana-de-açúcar (Teixeira, 2006).

A cana-de-açúcar é uma Poaceae que pertence à tribo Panicoide, subtribo Andropogeneae, família Gramineae, e gênero *Saccharum*. O provável centro de origem desta cultura é o Sudeste Asiático, nas regiões de Nova Guiné e Indonésia (Daniels & Roach, 1987). Seis espécies são descritas pertencentes ao gênero *Saccharum* (Amalraj & Balasundaram, 2006) e podem ser classificadas como: espécies selvagens, cultivares antigas (ou tradicionais) ou cultivares modernas (Grivet et al., 2004). Esta cultura adapta-se a diferentes condições e tem uma alta eficiência na produção de biomassa. Atualmente é a principal cultura estudada para a produção de açúcar, biocombustível e outros produtos secundários (Nonato et al., 2001; McQualter et al., 2004; Lakshmanan et al., 2005).

A cana-de-açúcar é uma excelente planta para se aplicar a transformação genética devido a algumas características, como a facilidade de regeneração por calo embriogênico (Heinz et al., 1977; Chen et al., 1988), assim como a sua capacidade de propagação vegetativa em escala comercial, onde transformantes estáveis podem ser produzidos para os produtores (Gallo-Meagher & Irvine, 1996). Contudo, é essencial o desenvolvimento de eficientes protocolos para produção de plantas por cultura de tecido (Desai et al., 2004).

Alguns trabalhos foram realizados com cultura de tecido de cana-de-açúcar (Barba & Nickell, 1969; Heinz & Mee, 1969). Usando a cultura de tecidos, é possível produzir em larga escala mudas saudáveis; complementando a propagação comercial desta cultura em vários países, como Brasil, Estados Unidos, Índia e Cuba (Lakshmanan et al., 2006). A propagação *in vitro* pode ser realizada por organogênese ou embriogênese somática (Taylor & Dukic, 1993; Falco et al., 1996; Lakshmanan et al., 2006). A embriogênese somática produz embriões utilizando tecido somático (Raemakers et al., 1995), ou de poucas

células (Litz & Gray, 1995). Os métodos utilizados para micropropagação de cana-de-açúcar são a cultura de meristema de brotos (Lee, 1987; Burner & Grisham, 1995), cultura de folhas jovens (Gill et al., 2006; Lakshmanan et al., 2006; Khan et al., 2009; Ramgareeb et al., 2010) e cultura de calos (Chengalrayan & Gallo-Meagher, 2001; Ali et al., 2008; Ather et al.; Rashid et al., 2009). Os tecidos produzidos por esses métodos podem ser utilizados em programas de transformação genética (Santosa et al., 2004; Joyce et al., 2010).

Neste presente trabalho relatamos as respostas morfogênicas de três cultivares brasileiras de cana-de-açúcar à indução de embriogênese somática e organogênese direta.

4 Materiais e métodos

4.1 Material vegetal

As cultivares RB867515, RB855156 e RB72454, obtidas via PMGCA – UFPR, foram utilizadas para este experimento. O ápice das plantas com 8 a 9 meses de idade foram coletadas no campo de produção, fornecendo o explante a ser utilizado. As folhas externas foram retiradas, e as folhas jovens do meristema apical foram lavadas com água estéril. Em condições assépticas, as folhas jovens do meristema apical foram desinfestadas com etanol 70% por um minuto e solução de hipoclorito de sódio 2,5% por 15 minutos. Adicionalmente, mais folhas foram retiradas, permanecendo a fonte de explante com 1 cm de diâmetro. Logo acima do meristema apical, segmentos transversais de 2-3 mm de espessura foram seccionados, gerando os explantes a serem utilizados. Foram seccionados 15 explantes por ápice para todo experimento.

4.2 Embriogênese somática

O meio de indução utilizado neste experimento é constituído de meio

MS sólido (Murashige & Skoog, 1962) contendo 20 g.L⁻¹ de sacarose, 100 mg.L⁻¹ de myo-inositol, 100 mg.L⁻¹ de PVP, 0,5 mg.L⁻¹ de ácido nicotínico, 0,15 mg.L⁻¹ de ácido cítrico, 1 mg.L⁻¹ de tiamina, 50 mg.L⁻¹ de cisteína, 2 mg.L⁻¹ de glicina, 50 mg.L⁻¹ de arginina, 0,5 mg.L⁻¹ de piridoxina e 50 mL.L⁻¹ água de côco (MSC3) (Heinz & Mee, 1969). Três concentrações do regulador de crescimento 2,4-D (ácido 2,4- diclorofenoxiacético) (1, 3 e 7 mg.L⁻¹) foram usadas. O pH do meio de indução foi ajustado para 5.7 ± 0.1 e autoclavado. Os explantes foram colocados em frascos de 250 mL (contendo 20 mL de meio de indução) e selados com tampas de polipropileno e incubados a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ no escuro. Cada tratamento continha 50 explantes. Respostas morfogênicas dos explantes foram avaliadas em três diferentes momentos (30, 45 e 60 dias).

4.3 Regeneração de brotos por calos embriogênicos

O meio de regeneração utilizado é composto de meio MS sólido contendo 20 mg.L⁻¹ de sacarose, 100 mg.L⁻¹ de myo-inositol e 100 mL.L⁻¹ de água de côco. O pH do meio de regeneração foi ajustado para 5.7 ± 0.1 e autoclavado. Os explantes foram colocados em frascos de 250 mL contendo 20 mL de meio de regeneração e selados com tampas de polipropileno e incubados a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ sob fotoperíodo de 16 horas de luminosidade. Aos 45 dias, os calos embriogênicos foram individualizados dos explantes e transferidos para um novo meio de indução (primeiro subcultivo). Após 21 dias e 42 dias, realizou-se o segundo e terceiro subcultivo, respectivamente. A resposta morfogênica de regeneração foi avaliada em cada subcultivo (1º, 2º e 3º subcultivo) e em três diferentes tempos (15, 30 e 45 dias). Cada tratamento consistiu de seis repetições experimentais.

4.4 Microscopia eletrônica em calos embriogênicos

Amostras de 2-3 mm de calos embriogênicos foram fixados em

glutaraldeído 2,5% e pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio (pH 7.4) por uma hora (Ho & Vasil, 1983). Os calos fixados foram desidratados em etanol 30, 50, 70, 80, 90 e 95% (10 minutos cada desidratação) e três vezes em etanol absoluto a 4 °C (30 minutos cada desidratação). Após a secagem ao ponto crítico feito no aparelho Oryer Emitech Critical Point K 850 (usando o CO₂ como fluido de transição), as amostras foram metalizadas com ouro no aparelho Emitech K 550 Sputter Coater. A visualização e captura de imagens foram feitas em microscópio eletrônico ZEISS DSM 962 AT.

4.5 Análise histológica em calos embriogênicos

Amostras de 2-3 mm de calos embriogênicos foram fixados em FAA 70% (formol a 40%, 5 mL; álcool a 70%, 90 mL e ácido acético glacial, 5 mL) por 8 horas sob vácuo (200 psi) (Ho & Vasil, 1983). Em seguida foram desidratados em etanol 70, 80, 90% e etanol absoluto (1 hora cada desidratação). Após a desidratação, as amostras foram embebidas em parafina para polimerização para posterior corte das amostras. Os cortes histológicos foram deparafinados e corados com fast green ácido (Mello & Vidal, 1978).

4.6 Organogênese direta

O meio de indução de organogênese é composto por meio MS sólido contendo 20 g.L⁻¹ de sacarose, 100 mg.L⁻¹ de myo-inositol e combinações dos reguladores de crescimento ANA (ácido α -naftalenoacético), cinetina (6-furfurilaminopurina) e BAP (6-benzilaminopurina) (Tabela 1). O pH do meio de indução foi ajustado para 5.7 ± 0.1 e autoclavado. Os explantes foram colocados em frascos de 250 mL (contendo 20 mL de meio de indução) e selados com tampas de polipropileno e incubados a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ sob fotoperíodo de 16 horas de luminosidade. Cada tratamento foi composto 25 explantes. A resposta

morfológica dos explantes foi avaliada em quatro tempos diferentes (30, 45, 60 e 75 dias).

4.7 Análises estatísticas

Todo experimento foi conduzido em blocos inteiramente casualizados, e os dados foram analisados por ANOVA (análise de variância). O teste de Duncan a 5% de probabilidade foi utilizado para a comparação das médias no software SAS.

5 Resultados e discussões

5.1 Produção de calos embriogênicos

Após o preparo do material vegetal, segmentos transversais (2-3 mm) foram colocados em meio de indução. Aos 30 dias observou-se resposta morfológica dos explantes (Figura 1) nas três cultivares testadas (RB867515, RB855156, RB72454) e nos três tratamentos (1, 3 e 7 mg.L⁻¹ de 2,4-D). A cultivar RB867515 obteve melhores resultados (90% de produção) usando 3 mg.L⁻¹ de 2,4-D, enquanto que as cultivares RB855156 e RB72454 obtiveram melhores resultados usando 3 e 7 mg.L⁻¹, respectivamente (Figura 2). Para a produção de calos embriogênicos ao longo do tempo, melhores resultados foram obtidos com 60 dias de incubação em meio de indução para a cultivar RB72454. A cultivar RB855156 apresentou melhores resultados a 45 e 60 dias. Não houve diferença significativa para o tempo de incubação em meio de indução para a cultivar RB867515 (Figura 3).

A formação de calo ocorreu nos três tratamentos, devido a presença do regulador de crescimento 2,4-D. O mesmo não ocorreu no controle negativo (meio basal sem 2,4-D). Estes resultados são similares aos encontrados por Ho & Vasil (1983), que estudaram a formação de calos embriogênicos em cana-de-

açúcar do clone 68-1067. Em cana-de-açúcar, a embriogênese primária é exclusivamente induzida em meio de cultura contendo auxinas (Raemakers et al., 1995). Auxinas, como o 2,4-D, são essenciais para induzir a formação de calos (Grattapaglia & Machado, 1990). De todos os reguladores de crescimento, o 2,4-D se mostrou mais eficiente na indução de calos e embriões somáticos. Quando este composto é aplicado em altas concentrações, os calos se apresentam mais mucilaginosos (Ho & Vasil, 1983).

Os resultados aqui apresentados mostram claramente a influência do genótipo sobre a formação de calos embriogênicos. Esses resultados corroboram o que já foi mostrado por Ho & Vasil (1983) e Desai et al. (2004), sendo que estes últimos descrevem esse fenômeno na cultivar CoC-671, plantada na Índia.

Trabalhando com a cultivar RB855156, Molinari et al. (2007) realizaram a transformação genética via biobalística desta planta. Foi usado o gene *P5CS*, objetivando maior produção de prolina (osmoprotetor) em resposta a déficit hídrico. Embriões somáticos foram utilizados como explantes, regenerando 1,7% de plantas transformadas.

5.2 Regeneração de brotos por calos embriogênicos

Após 45 dias em meio de indução, os calos produzidos pelos explantes foram individualizados e transferidos para um novo meio de indução (1º subcultivo). Após 21 dias e 42 dias, realizou-se o segundo e terceiro subcultivo, respectivamente. A resposta morfogênica de regeneração foi avaliada em cada subcultivo e em três diferentes tempos (15, 30 e 45 dias). Os resultados mostraram que a cultivar RB867515 obteve melhores resultados para a regeneração de calos embriogênicos (50 % de produção de brotos) provenientes de meio de indução contendo 1 e 3 mg.L⁻¹ de 2,4-D, realizando dois subcultivo e incubando por 30 ou 45 dias em meio de regeneração (Figuras 4). Poucos brotos foram regenerados da cultivar RB855156 e nenhum broto foi regenerado da

cultivar RB72454 (dados não apresentados).

A microscopia eletrônica de varredura e análise histológica mostraram imagens de calos embriogênicos e embriões somáticos nos diferentes tratamentos (Figura 5 e 6). Nas imagens de microscopia eletrônica de varredura da cultivar RB867515, foram observados embriões completamente formados (Figura 5A e 5B). Para as cultivares RB855156 e RB72454, observou-se a formação de embriões em um estágio bem inicial (Figuras 5C e 5D). As mesmas observações podem ser feitas nas imagens das análises histológicas, onde há embriões completamente formados para RB867515 (Figuras 6A – 6D), e formação de embriões para RB855156 e RB72454 (Figuras 6E – 6H). Isto explica os melhores resultados obtidos para RB867515 na regeneração de brotos.

Na regeneração de brotos proveniente de embriões somáticos, a sacarose pode influenciar a diferenciação celular e no desenvolvimento das raízes (Ho & Vasil, 1983). Outro fator impactante neste processo é o uso de complexos orgânicos e aminoácidos essenciais no meio de regeneração (Litz & Gray, 1995). A insuficiência na maturação dos embriões somáticos acarreta em desenvolvimento não satisfatório na produção de brotos (Raemakers et al., 1995). Esse fenômeno é chamado de germinação precoce e é o principal problema no desenvolvimento de embriões somáticos (Litz & Gray, 1995).

O uso de água de côco, que contém citocininas naturais, em meio de regeneração promove efeitos benéficos à morfogênese e desenvolvimento do broto (George et al., 2008). Contudo, a concentração dos compostos da água de côco não são constantes no fruto, ou mesmo nos produtos industrializados.

Os brotos regenerados através de calos embriogênicos foram produzidos neste experimento usando meio de regeneração sem auxina (50% de regeneração), assim como os trabalhos de Falco et al. (2000) e Snyman et al. (2006) (40% de regeneração).

5.3 Produção de brotos por organogênese direta

Segmentos transversais (2-3 mm) foram colocados em meio de indução de organogênese contendo combinações dos reguladores de crescimento ANA, Kin e BAP. Aos 30 dias observou-se resposta morfogênica dos explantes (Figura 7). Melhores resultados foram obtidos para RB855156 nos tratamentos M4, M6 e M7, incubando por 45, 60 ou 75 dias (Figuras 8 e 9). As cultivares RB867515 e RB72454 apresentaram uma baixa eficiência na produção de brotos, sendo inferiores a 20% (dados não apresentados). Não houve diferença significativa para a produção de brotos de RB867515 e RB72454.

A alta porcentagem na produção de brotos por organogênese direta para RB855156 foi obtida pelos tratamentos contendo combinações de ANA + Kin (tratamentos M4, M6 e M7). Resultados similares foram encontrados por Gill et al. (2006). Explantes de cana-de-açúcar da variedade CoJ83 incubadas em meio de indução contendo ANA (5 mg.L^{-1}) e Kin ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$) geraram altas produções de brotos. Ao adicionar 1 mg.L^{-1} de BA (6-benziladenina) à combinação ANA + Kin, não houve efeito sinérgico na geração de brotos (Gill et al., 2006).

A vantagem em utilizar a produção de brotos por organogênese direta é que se reduz o risco de aparecimento de variação somaclonal. Excessivas divisões celulares durante a fase de calo podem levar à variação somaclonal; o que é indesejável durante a clonagem de cultivares elites ou na transformação genética de variedades comerciais (Gill et al., 2006). A regeneração direta sem passar pela fase de calo tem sido relatada em outras monocotiledôneas como alho (Sata et al., 2000) e milho (Vikrant & Rashid, 2001).

Uma resposta morfogênica anormal, descrita como má formação da área foliar e radicular (folhas extremamente estreitas e pouco clorofiladas, e raízes clorofiladas, curtas e rígidas), foi observada (Figura 7C). Khan et al. (2009)

relatam que o tipo de citocinina utilizada no meio de indução tem efeitos marcantes no desenvolvimento de brotos, e que melhores resultados são obtidos usando cinetina (Kin) ao invés de BAP. Além disso, os brotos se apresentavam fundidos e com folhas anormais (Khan et al., 2009) quando se utilizava BAP no meio de indução. A variação da atividade das citocininas pode ser explicada pela sua absorção diferenciada (Blakesey, 1991), taxas de translocação variadas para a região meristemática e de processos metabólicos. As citocininas podem ser degradadas ou conjugadas com açúcares ou aminoácidos, formando compostos biologicamente inertes, como relatado por Tran Thanh Van & Trinh (1990).

6 Conclusão

Os resultados do estudo de indução de embriogênese somática mostram que esta é ser dependente do genótipo. O protocolo de indução de embriogênese somática foi altamente eficiente para as cultivares RB855156 (acima de 80% de produção) e RB867515 (acima de 90% de produção), usando 3 mg.L^{-1} de 2,4-D para ambas cultivares, e 45 e 30 dias de incubação, respectivamente. Alterações no protocolo são necessários para o cultivar RB72454, haja vista que a eficiência neste cultivar foi de apenas 50%.

A maior produção de brotos por calos embriogênicos foi obtida pela cultivar RB867515, com calos embriogênicos provenientes do meio de indução contendo 3 mg.L^{-1} de 2,4-D, realizando 2 subcultivos (em meio de indução) e incubando por 30 dias em meio de regeneração. Entretanto, para as cultivares RB855156 e RB72454, este protocolo de regeneração precisa ser ajustado.

A maior produção de brotos por organogênese direta foi obtida pela cultivar RB8855156, usando combinações de ANA (ácido α -naftalenoacético) e Kin (6-furfurilaminopurina), e incubando por 45 dias em meio de indução de organogênese. Para as cultivares RB867515 e RB72454, este protocolo demanda

modificações.

7 Agradecimentos

Agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Agradecemos também ao Dr. Alan Carvalho de Andrade da Embrapa – Cenargen, pela disponibilização do laboratório e suporte.

8 Referências

ALI, A.; NAZ, S.; SIDDIQUI, F.A.; IQBA, J. Rapid clonal multiplication of sugarcane (*Saccharum officinarum*) through callogenesis and organogenesis. **Pakistan Journal of Botany**, Lahore, v. 40, p. 123-138, 2008.

AMALRAJ, V. A.; BALASUNDARAM, N. On the taxonomy of the members of ‘*Saccharum* complex’. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Berlin, v. 53, p. 35-41, 2006.

ATHER, A.; KHAN, S.; REHMAN, A.; NAZIR, M. Optimization of the protocols for callus induction, regeneration and acclimatization of sugarcane cv. Thatta-10. **Pakistan Journal of Botany**, Lahore, v. 41, p. 815-820, 2009.

BARBA, R.; NICKELL, L.G. Nutrition and organ differentiation in tissue culture of sugarcane - a monocotyledon. **Planta**, Berkeley, v.89, p.299-302, 1969.

BLAKESEY, D. Uptake and metabolism of 6-benzyladenine in shoot proliferation of *Musa* and *Rhododendron*. **Plant Cell, Tissue and Organ**

Culture, Dordrecht, v. 25, p. 69-74, 1991.

BURNER, D.M.; GRISHAM, M.P. Induction and stability of phenotypic variation in sugarcane as affected by propagation procedure. **Crop Science**, Madison, v. 35, p. 875-880, 1995.

CHEN, W.H.; DAVEY, M.R.; POWER, J.B.; COCKING, E.C. Control and maintenance of plant regeneration in sugarcane callus cultures. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 39, p. 251-261, 1988.

CHENGALRAYAN, K.; GALLO-MEAGHER, M. Effect of various growth regulators on shoot regeneration of sugarcane. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Mariland, v. 37, p. 434-439, 2001.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Previsão de safra – Safra 2010 primeiro levantamento**. São Paulo: CONAB, 2010. Disponível em: <www.conab.gov.br>. Acesso em: 17 fev. 2010.

COSTA LIMA, M.A.; GARCIA, R.O.; MARTINS, G.S.; MANSUR, E. Morfogênese *in vitro* e susceptibilidade de calos de variedades nacionais de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) a agentes seletivos utilizados em sistemas de transformação genética. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, n. 1, 2001.

DANIELS, J.; ROACH, B.T. Taxonomy and evolution. In: HEINZ, D. J. (Ed.). **Sugarcane improvement through breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 7–84.

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

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

FALCO, M.C.; MENDES, B.M.J.; TULMANN NETO, A.; GLORIA, B.A. Histological characterization of in vitro regeneration of *Saccharum* sp. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Lavras, v. 9, p. 93-97, 1996.

FELIX, J.M. **Análise da expressão gênica envolvida no metabolismo de sacarose em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)**. 2006. 162 p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

GALLO-MEAGHER, M.; IRVINE, J.E. Herbicide resistant transgenic sugarcane plants containing the *bar* gene. **Crop Science**, Madison, v. 36, p. 1367-1374, 1996.

GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G.J. **Plant propagation by tissue culture** (3rd ed.) Amsterdam: The Background Springer, 2008, v. 1, p. 501.

GILL R.; MALHOTRA, P.K.; GOSAL S.S. Direct plant regeneration from cultured young leaf segments of sugarcane. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 84, p. 227-231, 2006.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas**. Brasília, ABCTP/EMBRAPA – CNPH, p. 99-169, 1990.

GRIVET, L.; DANIELS, C.; GLASZMANN, J. C.; D'HONT, A. A review of recent molecular genetics evidence for sugarcane evolution and domestication. **Ethnobotany Research & Applications**, Hawaii, v. 2, p. 9-17, 2004.

HEINZ, D.J.; MEE, G.W.P. Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. **Crop Science**, Madison, v. 9, p. 346-348, 1969.

HEINZ, D.J.; KTISHNAMURTHI, M.; NICKELL, L.G.; MARETZKI, A. Cell, tissue and organ culture in sugarcane improvement. In: REINERT, J.; BAJAJ, V.P.S. (Ed.). **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture**. Berlin: Springer Verlag, 1977. p. 3-17.

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

JOYCE, P.; KUWAHATA, M.; TURNER, N.; LAKSHMANAN, P. Selection system and co-cultivation medium are important determinants of *Agrobacterium* mediated transformation of sugarcane. **Plant Cell Report**, Berlin, v. 29, p. 173-183, 2010.

KHAN, I.A.; DAHOT, M.U.; SEEMA, N.; YASMEEN, S.; BIBI, S.; RAZA, G.; KHATRI, A.; NAQVI, M.H. Direct regeneration of sugarcane plantlets: a

tool to unravel genetic heterogeneity. **Pakistan Journal of Botany**, Lahore, v. 41, p. 797-814, 2009.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R.; AITKEN, K.S.; GROF, C.L.P.; BONNETT, G.D.; SMITH, G.R. Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Mariland, v.41, p.345-363, 2005.

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

LEE, T.S.G. Micropropagation of sugarcane (*Saccharum* spp.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 10, p. 47-55, 1987.

LITZ, R.E. & GRAY, D.J. Somatic embryogenesis for agricultural improvement. **World journal of Microbiology & Biotechnology**, Berlin, v. 11, p. 416-425, 1995.

MCQUALTER, R.B.; FONG CHONG, B.; O'SHEA, M.; MEYER, K.; VAN DYK, D.E.; VIITANEN, P.V.; BRUMBLEY, S.M. Initial evaluation of sugarcane as a production platform for p-hydroxybenzoic acid. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 2, p. 1-13, 2004.

MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. A reação de Feulgen. **Ciência e cultura**, Campinas, v. 30, p. 665-676, 1978.

MOLINARI, H. B. C., MARUR, C. J., DAROS, E., DE CAMPOS, M. K. F., DE CARVALHO, J. F. R. P., FILHO, J. C. B., PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 130, p. 218–229, 2007.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 15, p. 473-497, 1962.

NONATO, R.V.; MANTELATTO, P.E.; ROSSELL, C.E.V. Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 57, p. 1-5, 2001.

RAEMARKERS, C.J.J.M.; JACOBSEN, E. & VISSER, R.G.F. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. **Euphytica**, Wageningen, v. 81, p. 93-107. 1995.

RAMGAREEB, S.; SNYMAN, S.J.; VAN ANTWERPEN, T.; RUTHERFORD, R.S. Elimination of virus and rapid propagation of disease-free sugarcane (*Saccharum* spp.cultivar NCo376) using apical meristem culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 100, p. 175-181, 2010.

RASHID, H.; ALI KHAN S.; ZIA M.; CHAUDHARY, M. F.; HANIF Z.; CHAUDARY Z. Callus induction and regeneration in elite sugarcane cultivar hsf-240. **Pakistan Journal of Botany**, Lahore, v. 41, p. 1645-1649, 2009.

RIBEIRO, C.W. **Estabelecimento de uma cana-de-açúcar transgênica superexpressando o gene da canacistatina (Cane CPI-1), uma proteína inibidora de cisteíno-protease.** 98 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.

SACIOTO, R.F.Z. **Inserção do gene PR5K em cana-de-açúcar visando induzir resistência ao fungo da ferrugem *Puccinia melanocephala*.** 74p. DISSERTAÇÃO (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

SANTOSA, D.A.; HENDROKO, R.; FAROUK, A.; GREINER, R. A rapid and highly efficient method for transformation of sugarcane callus. **Molecular Biotechnology**, Berlin, v. 28, p. 113-120, 2004.

SATA, S.J.; BAGATHARIA, S.B.; THAKER, V.S. Induction of direct embryogenesis in garlic (*Allium sativum*). **Methods in Cell Science**, Berlin, v. 22, p. 299-304. 2000.

SNYMAN, S.J. MEYER, G.M.; RICHARDS, J.M.; HARICHARAN, N.; RAMBAREEB, S.; HUCKETT, B.I. Refining the application of direct embryogenesis in sugarcane: effect of the developmental phase of leaf disk explants and the timing of DNA transfer on transformation efficiency. **Plant Cell Report**, Berlin, v. 25, p. 1016-1023, 2006.

STUPIELLO, J.P. A cana-de-açúcar como matéria-prima. In: PARANHOS, S.B. (Ed.). **Cana-de-açúcar: cultivo e utilização.** Campinas: Fundação Cargil, 1987. v. 2, p. 187-259.

TAYLOR, P.W.J.; DUKIC, S. Development of an in vitro culture technique for conservation of *Saccharum* spp. hybrid germplasm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 34, p. 217-222, 1993.

TEIXEIRA, L. H. M. **Mapeamento funcional em cana-de-açúcar utilizando ESTs como marcadores moleculares**. Campinas, 2006. Dissertação (Mestrado) – UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas.

TRAN THANH VAN, K. AND TRINH, T.H. Organogenic differentiation. In: Bhojwani, S.S. (Ed.). **Plant Tissue Culture**. Application and Limitations. Amsterdam: Elsevier, 1990, p.34-53.

VIKRANT, A.; RASHID, A. Direct as well as indirect somatic embryogenesis from immature (unemerged) inflorescence of a minor millet *Paspalum scrobiculatum* L. **Euphytica**, Wageningen, v. 120, p. 167-173, 2001.

Tabelas e FigurasTabela 1 Combinações de reguladores de crescimento em mg.L⁻¹ para indução de organogênese direta em cana-de-açúcar.

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12**
ANA*	10	0	0	5	5	10	10	5	5	10	10	0
Kin	0	1	0	0,5	1	0,5	1	0	0	0	0	0
BAP	0	0	2	0	0	0	0	1	2	1	2	0

*ANA – Ácido α naftaleno acético, Kin - 6- furfurilaminopurina e BAP – 6 - benzilaminopurina.

**M12 - tratamento controle.

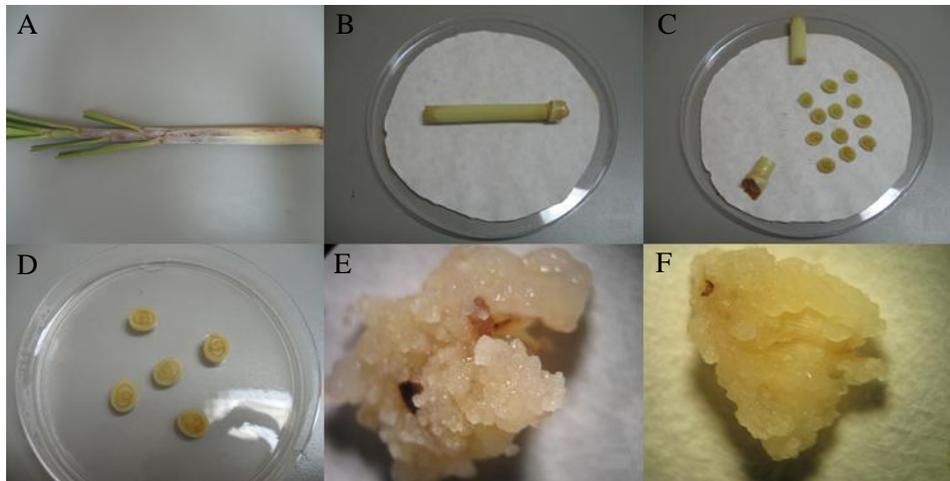


Figura 1 Preparação das amostras e formação de calos em cana-de-açúcar. A – ápice da planta sem as folhas velhas; B – folhas jovens após desinfestação; C – explantes de folhas jovens próximos ao meristema apical; D – secções transversais dos explantes em meio de indução; E- calo embriogênico; F –calo não-embriogênico.

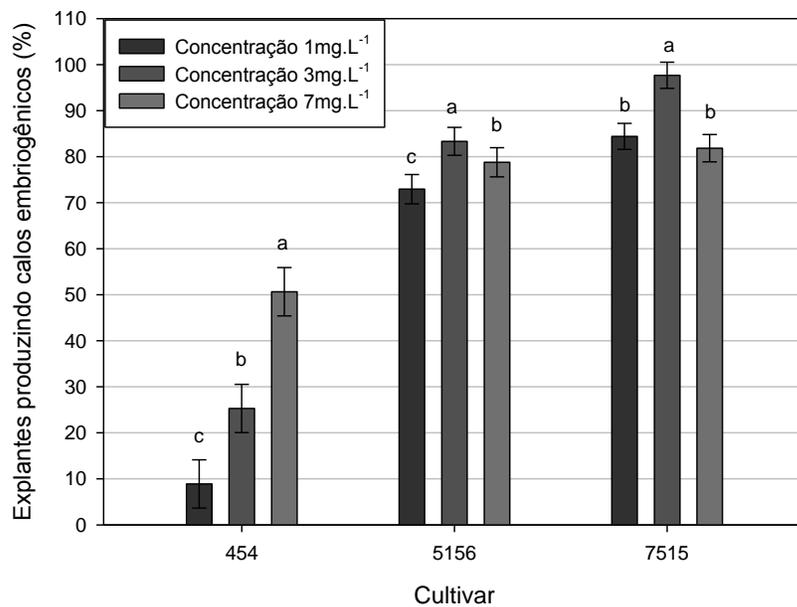


Figura 2 Calos embriogênicos de cana-de-açúcar obtidos após 60 dias em meio de indução suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D. Em cada categoria, valores com a mesma letra não diferem pelo Teste de Duncan ($P < 0,05$).

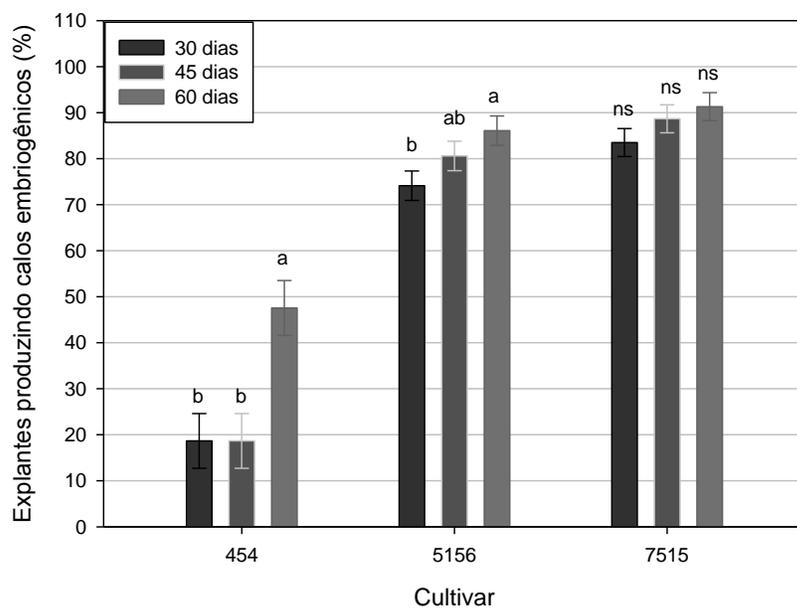
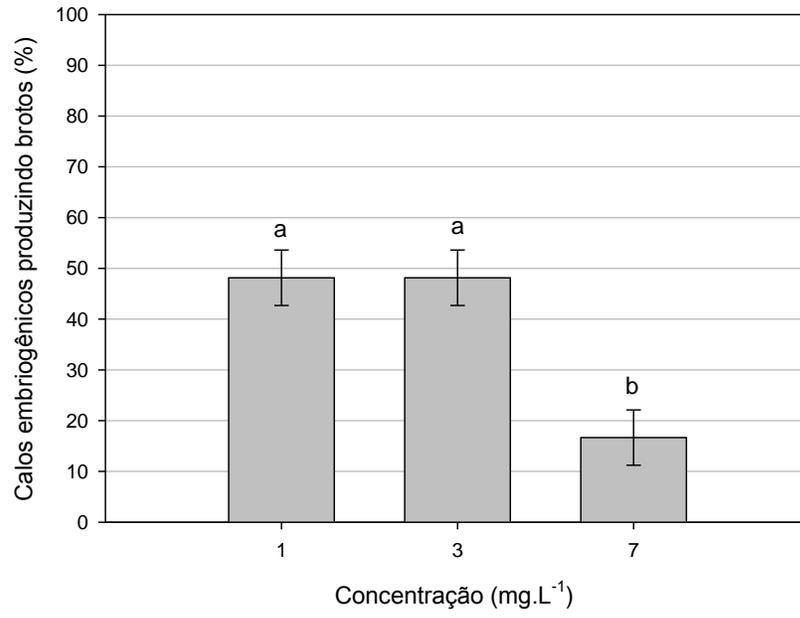
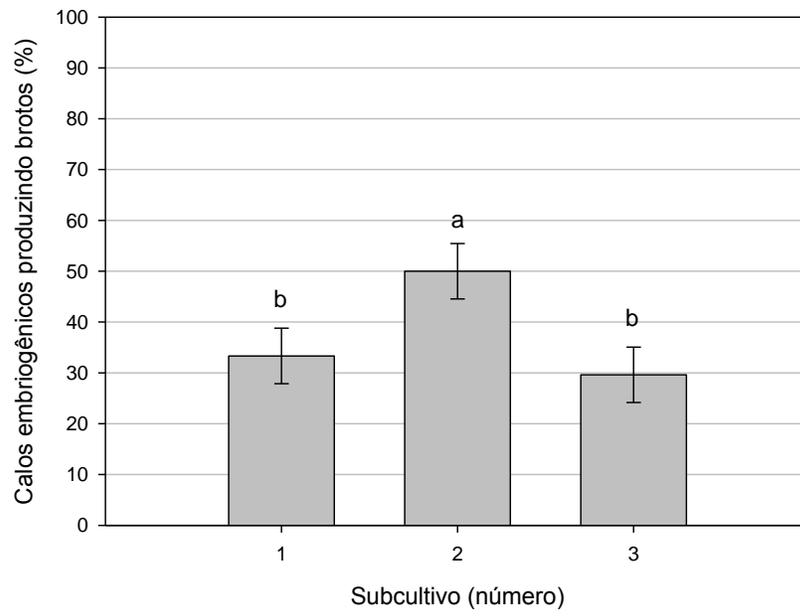


Figura 3 Calos embriogênicos de cana-de-açúcar obtidos em três tempos de incubação em meio de indução suplementado. ns – diferença não significativa. Em cada categoria, valores com a mesma letra não diferem pelo Teste de Duncan ($P < 0,05$).

A



B



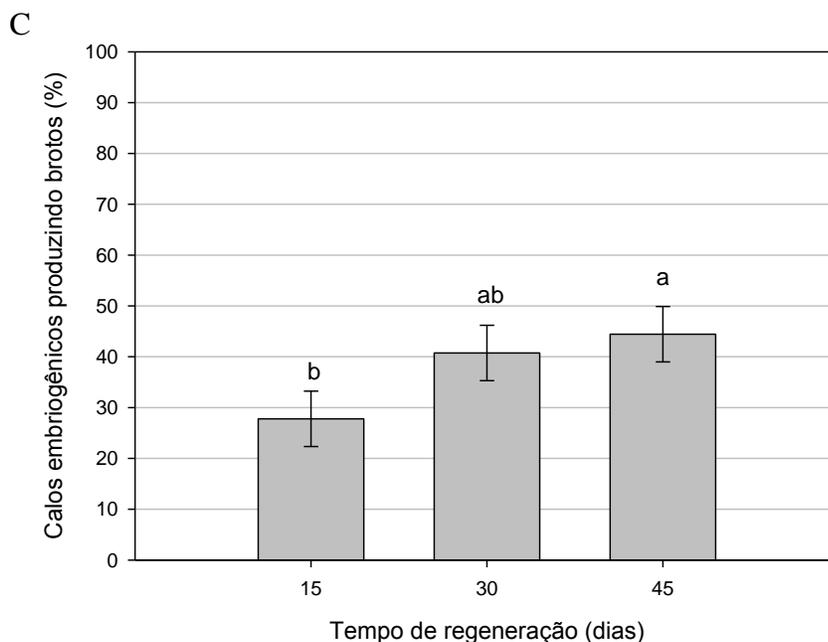


Figura 4 A – Calos embriogênicos da cultivar RB867515 obtidos após 45 dias em meio de indução suplementado com 2,4-D, subcultivados e transferidos para o meio de regeneração. A porcentagem de calos embriogênicos que produziram brotos foi avaliada em meio de regeneração, sendo os calos obtidos a partir de diferentes concentrações de 2,4-D (1, 3 e 7 mg.L⁻¹) na indução. B – Calos embriogênicos da cultivar de RB867515 obtidos após 45 dias em meio de indução suplementado com 2,4-D, subcultivados e transferidos para meio de regeneração. A porcentagem de calos embriogênicos que produziram brotos foi avaliada nos diferentes de subcultivos. C - Calos embriogênicos da cultivar de RB867515 obtidos após 45 dias em meio de indução suplementado com 2,4-D, subcultivados e transferidos para meio de regeneração. A porcentagem de calos embriogênicos que produziram brotos foi avaliada em tempos diferentes de regeneração. Colunas com a mesma letra não diferem pelo Teste de Duncan (P<0,05).

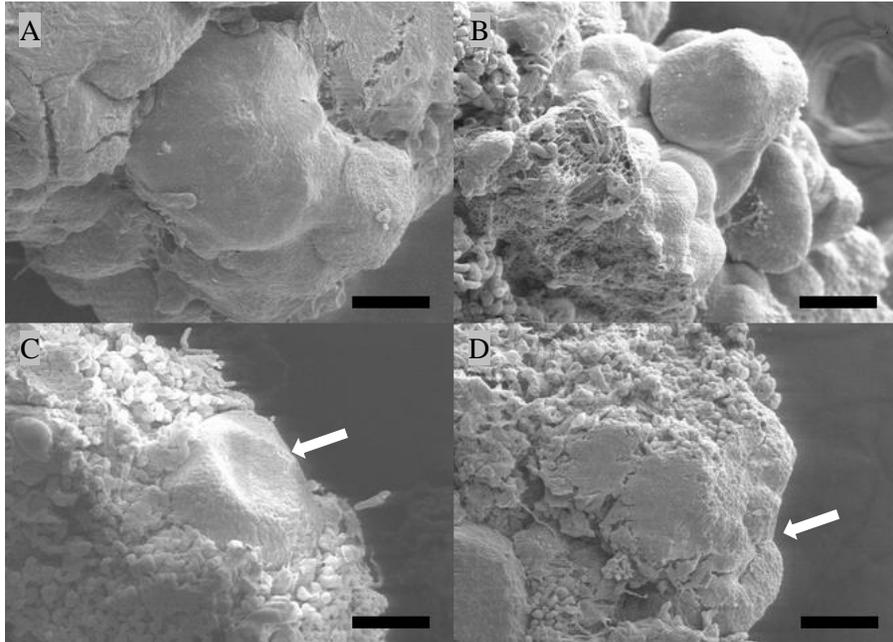


Figura 5 Embriões de cana-de-açúcar analisados através de microscopia eletrônica de varredura. A, B – Embriões formados da cultivar RB867515 obtidos após 45 dias em meio de indução suplementado com 1 e 3 mg.L⁻¹ de 2,4-D respectivamente, após dois subcultivos. C, D – Início da formação de embriões (setas) das cultivares RB855156 e RB72454, após 45 dias em meio de indução suplementado com 3 e 7 mg.L⁻¹ de 2,4-D respectivamente, após dois subcultivos. Barras = 200µm (100x).

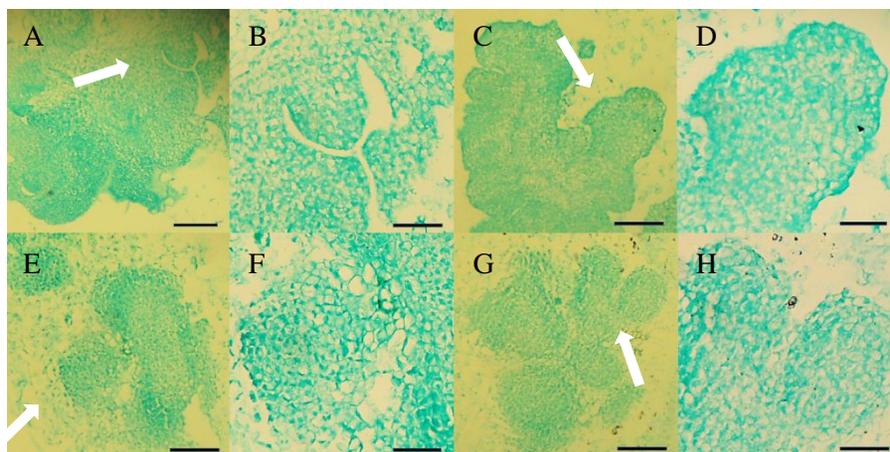


Figura 6 Análise histológica. A, C – Embriões formados da cultivar RB867515 obtidos após 45 dias em meio de indução suplementado com 1 e 3 mg.L^{-1} de 2,4-D respectivamente, após dois subcultivos. B, D – Detalhes das figuras A e B (setas), respectivamente; E, G – Geração de embriões para as cultivares RB855156 e RB72454, após 45 dias em meio de indução suplementado com 3 e 7 mg.L^{-1} de 2,4-D, respectivamente, após dois subcultivos; F, H – Detalhe das figuras E e G (setas), respectivamente; A, C, E, G – Barras = 100 μm (4x); B, D, F, H – Barras = 50 μm (10x).

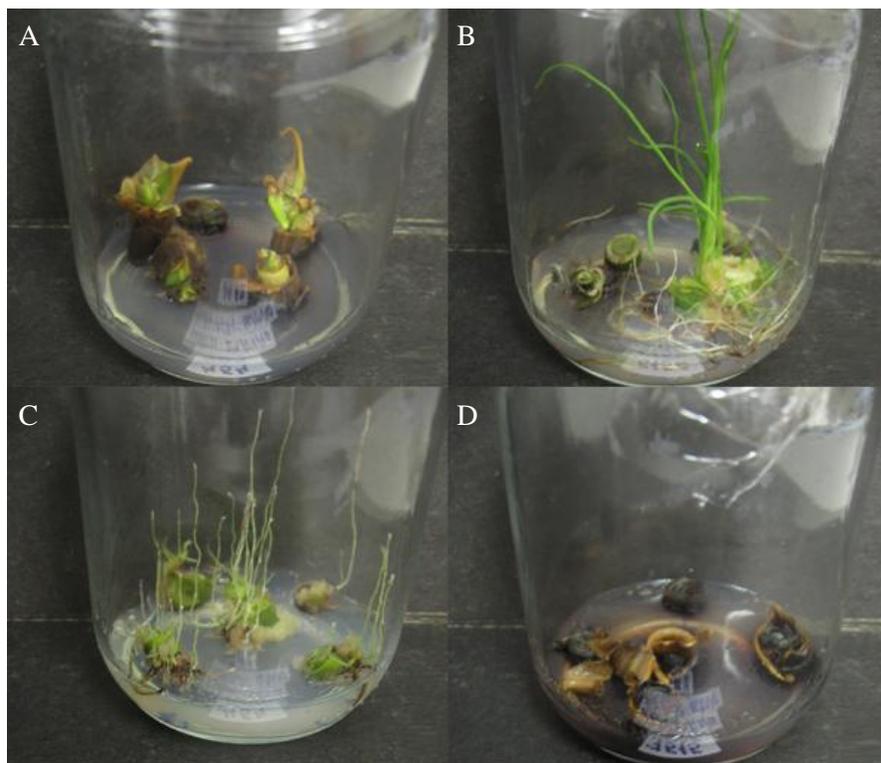


Figura 7 Resposta morfo genética de explantes de cana-de-açúcar após 75 dias em meio de indução: A – tratamento controle (M12); B – Desenvolvimento de organogênese normal (brotos); C – Desenvolvimento de organogênese anormal; D – Explantes oxidados.

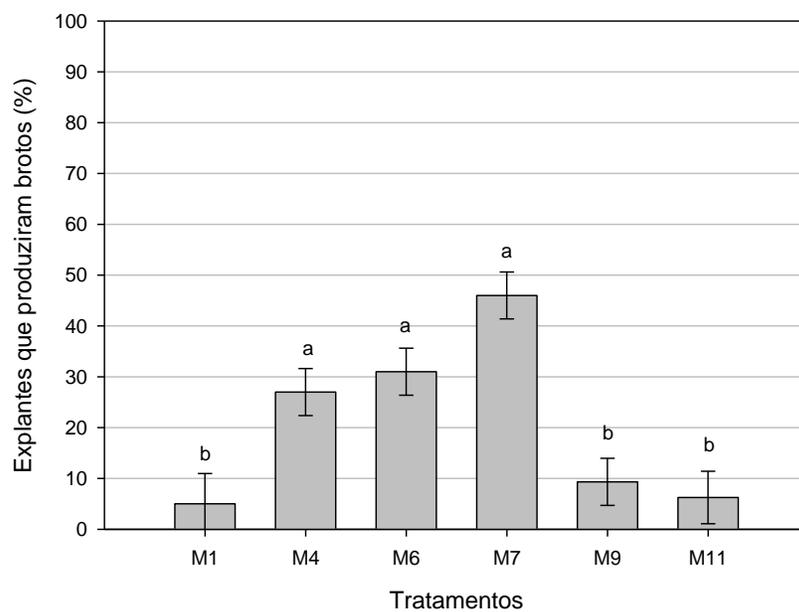


Figura 8 Organogênese direta da cultivar RB855156 obtida após 75 dias em meio de indução suplementado com diferentes combinações de reguladores de crescimento (Tabela 1). Os tratamentos M2, M3, M5, M8, M10 e M12 não geraram brotos (0%). Os valores com a mesma letra não diferem pelo Teste de Duncan ($P < 0,05$).

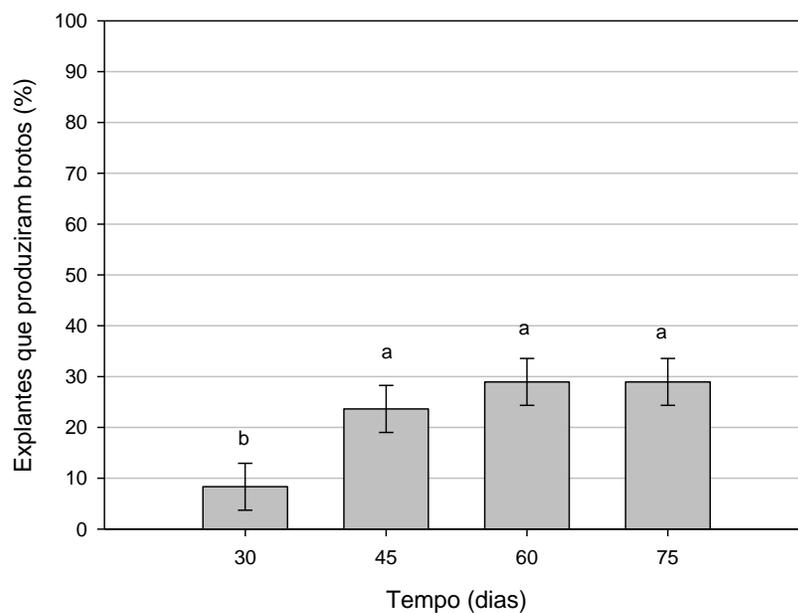


Figura 9 Organogênese direta da cultivar RB855156 obtida após quatro diferentes tempos em meio de indução suplementado com diferentes concentrações e combinações de reguladores de crescimento (Tabela 1). Em cada categoria, valores com a mesma letra não diferem pelo Teste de Duncan ($P < 0,05$).