

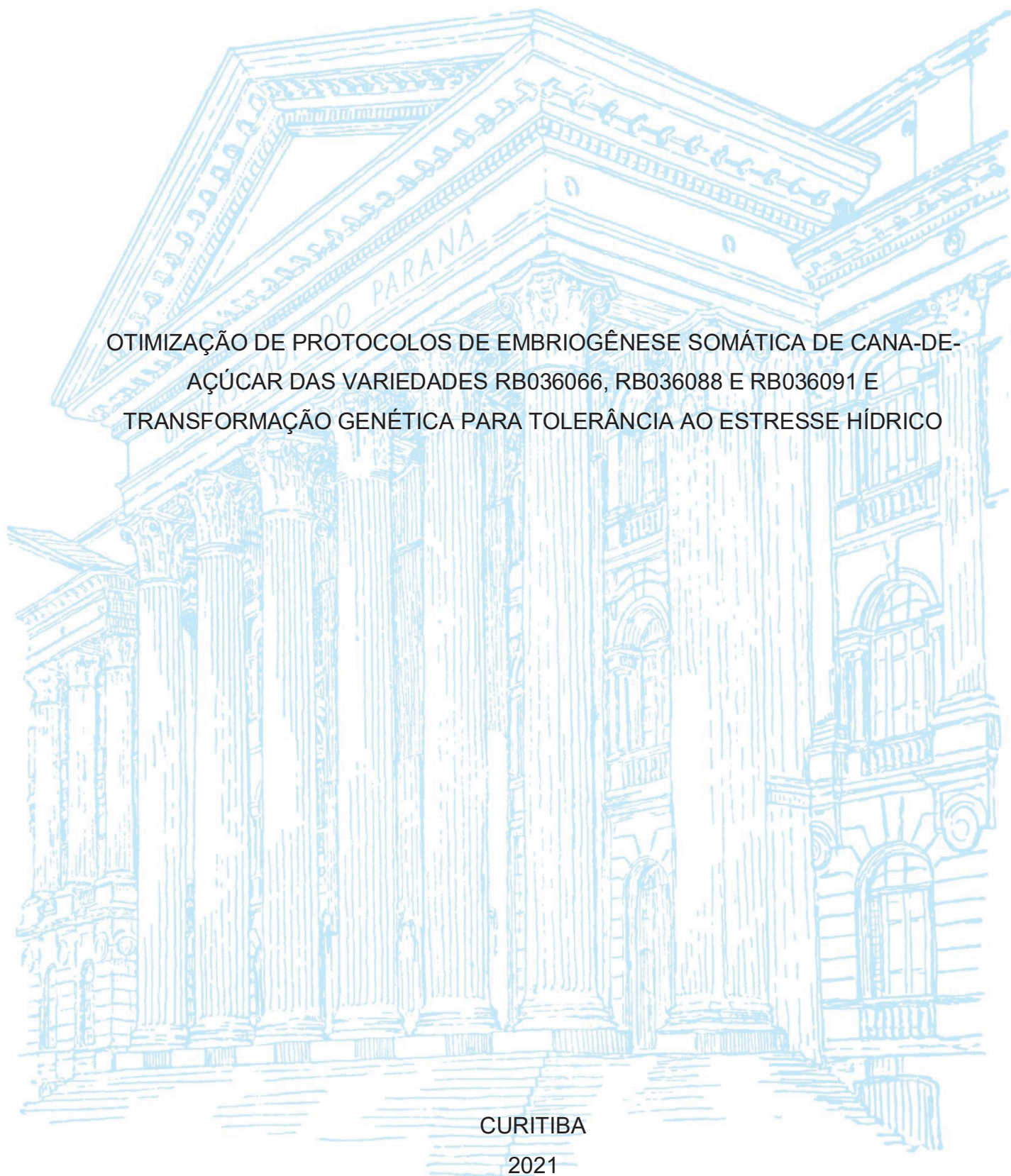
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIANA ALMEIDA FRANCA

OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE CANA-DE-
AÇÚCAR DAS VARIEDADES RB036066, RB036088 E RB036091 E
TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA PARA TOLERÂNCIA AO ESTRESSE HÍDRICO

CURITIBA

2021



MARIANA ALMEIDA FRANCA

OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE CANA-DE-
AÇÚCAR DAS VARIEDADES RB036066, RB036088 E RB036091 E
TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA PARA TOLERÂNCIA AO ESTRESSE HÍDRICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Bessalho Filho

Coorientadora: Profa. Dra. Giovana Bomfim de Alcantara

CURITIBA

2021

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Franca, Mariana Almeida

Otimização de protocolos de embriogênese somática de cana-de-açúcar das variedades RB036066, RB036088 E RB036091 e transformação genética para tolerância ao estresse hídrico / Mariana Almeida Franca. – Curitiba, 2021.

1 recurso online: PDF.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal).

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Bepalhok Filho

Coorientadora: Profa. Dra. Giovana Bomfim de Alcantara

1. Cana-de-açúcar. 2. Técnicas de Embriogênese Somática de Plantas. I. Bepalhok Filho, João Carlos. II. Alcantara, Giovana Bomfim de. III. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal). IV. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO AGRONOMIA
(PRODUÇÃO VEGETAL) - 40001016031P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **MARIANA ALMEIDA FRANCA** intitulada: **OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE CANA-DE-AÇÚCAR DAS VARIEDADES RB036066, RB036088 E RB036091, E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA PARA TOLERÂNCIA AO ESTRESSE HÍDRICO**, sob orientação do Prof. Dr. JOÃO CARLOS BESPALHOK FILHO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 03 de Dezembro de 2021.

Assinatura Eletrônica

03/12/2021 18:10:56.0

JOÃO CARLOS BESPALHOK FILHO
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

06/12/2021 09:50:50.0

GIOVANA BOMFIM DE ALCANTARA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

03/12/2021 22:28:05.0

LUIZ ANTONIO BIASI
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

09/12/2021 10:00:55.0

ROBERSON DIBAX
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL)

Rua dos Funcionários, 1540 - CURITIBA - Paraná - Brasil
CEP 80035-050 - Tel: (41) 3350-5601 - E-mail: pgapv@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 132507

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 132507

À minha querida e amada mãe: Maria Saleth (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

A conclusão deste trabalho só foi possível porque diferentes pessoas, direta ou indiretamente, viabilizaram a sua execução. Assim, eu só tenho a agradecer pelo apoio e ajuda de cada um.

Agradeço ao meu orientador e mentor Professor Dr. João Carlos Bernalhok Filho, por toda orientação, acolhimento, aconselhamento e paciência. Sem o seu apoio e compreensão não seria possível concluir este trabalho e nem ter o crescimento profissional que desenvolvi durante estes anos.

À minha coorientadora Professora Dra. Giovana Bomfim de Alcantara, por toda orientação, ensinamentos e treinamentos. Por toda dedicação em me auxiliar durante todo o desenvolvimento do trabalho, principalmente a parte prática.

À Universidade Federal do Paraná que me recebeu de portas abertas, me fornecendo toda a estrutura necessária para realizar esta pesquisa. Juntamente com a RIDESA, que me forneceu o material vegetal, a FUNPAR responsável pela compra de materiais. Ao Laboratório de Micropropagação de Plantas da UFPR nas pessoas do Professor Dr. Luiz Antônio Biasi e do técnico Carlos Maduro. Ao Laboratório de Ecofisiologia na pessoa do técnico Roger Cipriano por todo auxílio na realização das análises. Ao Laboratório de Biologia Molecular e ao Laboratório de Bioquímica pelo fornecimento de nitrogênio líquido para as análises. Às meninas da limpeza, em especial a Maria Valdete por todo carinho e alegria que transmite para todos a sua volta. Ao programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal na pessoa da Lucimara que sempre esteve à disposição dos alunos e a CAPES que me cedeu à bolsa durante os anos de pesquisa.

Aos colegas do laboratório que tornaram o dia a dia muito mais leve com muitas risadas, conversas e ajuda. Aos estagiários por todo auxílio e pela oportunidade de aprender a liderar e gerir a projetos.

Aos amigos que fiz na pós-graduação (Renata, Ângelo, Maíra, Jéssica, Cintia, Juliane, Ana Paula, Tatiane, Juliana, Tales, Marcela e Mariana) por todo apoio emocional, ajuda nos experimentos e momentos de lazer compartilhados. Agradeço em especial a Laudiane, amiga e sócia, por toda ajuda principalmente na reta final deste trabalho e por embarcar comigo neste mundo do empreendedorismo.

Ao Elci por todo carinho e amor, aos dias de lavagens de vidraria, ajuda nas avaliações, fotos e análises, por toda paciência, incentivo e respeito pelo meu trabalho.

Agradeço à minha Tia Guinha que me deu a oportunidade de morar em Curitiba. À minha prima Kaká que me trouxe para esta cidade, por todo o apoio e todos os momentos bons e ruins que sempre dividimos. Obrigada, também, por me emprestar os seus amigos, como a Vanessa que se tornou uma grande amiga.

Agradeço aos meus pais Saleth e Fernando (*in memoriam*) que são a base da minha vida, por todo amor e carinho, pelos ensinamentos que me passaram e por todos os esforços que sempre fizeram para que eu e meu irmão pudéssemos ter acesso à educação. Sei que, onde quer que estejam, também estão felizes por esta vitória e esta conquista é de vocês! Ao meu irmão que sempre apoiou as minhas decisões, dando incentivo e segurando as pontas para eu alcançar os meus sonhos.

E a Deus que abriu os caminhos para eu pudesse chegar até aqui, ouviu as minhas preces, sempre me iluminou e cuidou tão bem da minha vida!

A todos que de alguma forma me ajudaram, o meu muito obrigada!

“O analfabeto do século XXI não será aquele que não sabe ler nem escrever, mas aquele que não consegue aprender, desaprender e, no fim, aprender de novo. ”

- ALVIN TOFFLER -

RESUMO

O estresse hídrico é uma das causas da queda na produtividade da cana-de-açúcar e impede a expansão da cultura para áreas com chuvas irregulares e sem irrigação. Para mitigar os danos causados pelo estresse, a transformação genética pode ser uma grande aliada, pois viabiliza a inserção de um gene externo no DNA vegetal. O gene *P5CS* de *Vigna aconitifolia* tem sido inserido em diferentes espécies para incremento no teor de prolina visando o efeito osmoprotetor e osmoregulador. Assim, o objetivo deste trabalho foi a integração do plasmídeo pJS107, contendo o gene *P5CS* e o gene *bar* como gene de seleção, em cana-de-açúcar por biobalística. Para isso, foram desenvolvidos protocolos de embiogênese somática para as variedades RB036088, RB036066 e RB036091. Foram realizados 5 tratamentos com concentrações de 2,4-D (0, 1, 3, 9, 18 μM) para indução de calos e 3 tipos de explantes (porção apical, mediana e basal do segmento meristemático de folhas imaturas). A multiplicação dos calos foi realizada no mesmo meio de cultura da indução e a conversão em meio de cultura MS sem adição de reguladores. A multiplicação das plantas foi realizada utilizando meio MS com adição de 0,88 μM de BAP e 0,46 μM de KIN e no enraizamento testou-se os meios MS, MS com metade dos sais, MS com adição de 70 g L⁻¹ de sacarose e MS acrescido de 2,46 μM AIB, também foi avaliada a taxa de sobrevivência na aclimatização. As concentrações mais recomendadas para indução e posterior conversão de calos foi de 3 μM de 2,4-D para as variedades RB036091, RB036066 e 9 μM de 2,4-D RB036088. Para o enraizamento e sobrevivência na aclimatização o meio MS com 70g L⁻¹ de sacarose para as variedades RB036088 e RB036091 e o MS meia força para a variedade RB036066 foram os mais adequados. Com os resultados, a variedade RB036088 foi escolhida para ser utilizada nos testes de transformação. Por meio da biobalística, embriões somáticos foram transformados, com micropartículas de tungstênio e pressão de ruptura de 1.200 psi. A eficiência da transformação, considerando os putativos selecionados em meio seletivo, foi de 3%. Foram obtidos eventos, confirmados por PCR pela amplificação gene de seleção *bar*. Porém, eles não apresentaram sinal de expressão do gene *bar* na PCR em tempo real e não houve biossíntese de prolina superior ao controle negativo quando os eventos foram expostos, *in vitro*, a situação de estresse (-0,9 Mpa). O método utilizado para transformação dos embriões foi eficiente, porém o conteúdo de prolina nos eventos foi inferior ao esperado.

Palavras-chave: *Saccharum spp.*, Prolina, *P5CS*, Calos embriogênicos, Biobalística

ABSTRACT

The drought stress is one the cause for low productivity in sugarcane and prevent the culture expansion for regions with irregular rainfalls and water limited environment. To mitigate damage caused by drought stress, the genetic transformation can be a great ally, because it viabilize the insertion of an external gene into plant DNA. The P5CS gene of *Vigna aconitifolia* has been inserted in different species to increase the proline content, aiming at the osmoprotective and osmoregulatory effect. Therefore, the objective of this work was the integration of pJS107 plasmid, containing the P5CS gene and the bar gene as selection gene, in sugarcane by biolistic. For that, they was developed somatic embryogenesis protocols for cultivars RB036088, RB036066 e RB036091. Five treatments with different concentrations of 2.4-D (0, 1, 3, 9, 18 μM) for callus induction and 3 types of explants (apical, median and basal portion of the meristematic segment of immature leaves) were performed. The multiplication of callus was performed in the same culture medium of induction and the conversion on MS culture medium without addition of regulators. The multiplication of plants was performed using MS medium with addition of 0.88 μM of BAP and 0.46 μM of KIN and it was tested for the rooting, MS medium, MS with half of the salts, MS with addition of 70 g L⁻¹ of sucrose and MS plus 2.46 μM of AIB, the survival rate in acclimatization was also evaluated. The most recommended concentrations for induction and subsequent callus conversion were 3 μM of 2.4-D for cultivars RB036091, RB036066 and 9 μM of 2.4-D for RB036088. For rooting and survival in acclimatization, the MS medium with 70 g L⁻¹ sucrose for cultivars RB036088 and RB036091 and half-strength MS for cultivar RB036066 were the most suitable. With these results, the variety RB036088 was chosen to be used in the transformation tests. Through biolistic, somatic embryo were transformed, with tungsten microparticles and burst pressure of 1,200 psi. The transformation efficiency, considering the putatives selected in selective medium, was 3%. They were obtained events, confirmed by PCR through selection gene *bar* amplification. However, they do not presented the gene *bar* expression signal on real time PCR and there was not proline biosynthesis superior of negative control when the events were exposed, *in vitro*, to stress situation (-0.9 Mpa). The method used for embryo transformation was efficient, however the quantity of proline in the events was less than expected.

Keywords: *Saccharum spp.*, Proline, P5CS, Embryogenic callus, Biolistics

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESQUEMA DOS MECANISMOS EM RESPOSTA À SECA NA CANA-DE-AÇÚCAR.....	18
FIGURA 2 - OSMORREGULAÇÃO CELULAR DURANTE ESTRESSE OSMÓTICO	25
FIGURA 3 – AS PRINCIPAIS VIAS DO METABOLISMO DA PROLINA	27
FIGURA 4 - APARELHO DE BIOBALÍSTICA MODELO: PDS-1000/HE PARTICLE DELIVERY SYSTEM - BIO-RAD LABORATORIES, INC.	32
FIGURA 5 - ETAPAS DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DAS VARIEDADES RB036088, RB036091 E RB036066 DE CANA-DE-AÇÚCAR. A) PALMITO DE CANA-DE-AÇÚCAR UTILIZADO PARA RETIRADA DOS EXPLANTES COM INDICAÇÕES DAS PORÇÕES BASAL, MEDIANA E APICAL. B) CORTE DOS DISCOS FOLIARES QUE FORAM UTILIZADOS COMO EXPLANTES. C) DISPOSIÇÃO DOS EXPLANTES EM PLACA DE PETRI. D) EXPLANTE COM PRESENÇA DE MASSA CALOSA APÓS 20 DIAS DE CULTIVO. E) <i>CLUSTERS</i> DE CALOS DISPOSTOS EM PLACA DE PETRI COM MEIO MS COM ADIÇÃO 30 G L ⁻¹ DE SACAROSE. F) CALOS EMBRIOGÊNICOS CONVERTIDOS EM MASSA VERDE. G) MULTIPLICAÇÃO DE PLÂNTULAS EM MEIO MS LÍQUIDO COM 0,46 µM KIN E 0,88 µM DE BAP. H) PLANTAS APÓS 10 DIAS DA ACLIMATIZAÇÃO.	54
FIGURA 6 - ASPECTOS DA MORFOGÊNESE DE CALOS DE CANA-DE-AÇÚCAR COM 55 DIAS DE CULTIVO. A) MASSA CALOSA EM MEIO DE CULTURA COM 9 µM DE 2,4-D DESTACANDO CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS (E), CÉLULAS NÃO EMBRIOGÊNICAS (NE) E CÉLULAS OXIDADAS (CO). B) TESTE CITOQUÍMICO CARMIN ACÉTICO E AZUL DE EVANS EM CÉLULAS OXIDADAS. C) TESTE CITOQUÍMICO CARMIN ACÉTICO E AZUL DE EVANS EM CÉLULAS NÃO EMBRIOGÊNICAS. D) TESTE CITOQUÍMICO CARMIN ACÉTICO E AZUL DE EVANS EM CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS....	61
FIGURA 7 - EFEITO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA PARA ENRAIZAMENTO DAS VARIEDADES RB036091, RB036066 E RB036088 DE CANA-DE-AÇÚCAR COM 15 DIAS DE CULTIVO. A)	

COMPRIMENTO DA MAIOR RAIZ, B) ÁREA DAS RAÍZES (CM²).
CULTIVO NOS MEIOS DE CULTURA MS, MS COM ADIÇÃO DE 70G
L⁻¹ DE SACAROSE, MS COM 2,46 µM DE AIB E MS COM METADE
DOS SAIS. MÉDIAS SEGUIDAS PELA MESMA LETRA MAIÚSCULA
NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE TUKEY P <0,01.....63

FIGURA 8 – DIAGRAMA DO PLASMÍDEO pJS107 UTILIZADO NOS
EXPERIMENTOS DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE CANA-DE-
AÇÚCAR.....75

FIGURA 9 - ANÁLISES DE PCR DE CANA-DE-AÇÚCAR VARIEDADE RB036088
PARA O GENE *bar* (450 pb). LINHA M -MARCADOR MOLECULAR;
LINHAS E12, E16, E24, E26, E 28 – PLANTAS TRANSGÊNICAS;
LINHAS E1, E4, E19, E34, E35 – ESCAPES; LINHA C.N – CONTROLE
NEGATIVO DE CANA-DE-AÇÚCAR VARIEDADE RB036088
(PLANTA NÃO TRANSFORMADA); C.P – CONTROLE POSITIVO
(PLASMÍDEO PJS107).....81

FIGURA 10 - TEOR DE PROLINA LIVRE (MMOL/G DE MATÉRIA FRESCA) EM
PLANTAS CONTROLE E TRANSGÊNICAS DE CANA-DE-AÇÚCAR
VARIEDADE RB036088 SUBMETIDAS A 15 DIAS DE CULTIVO EM
MEIO DE CULTURA COM POTENCIAL OSMÓTICO DE 0MPA E -
9MPA.....84

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 - PORCENTAGEM DE EXPLANTES FOLIARES COM CALOS, CULTIVADOS EM MEIO MS, EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE 2,4-D E DO TIPO DE EXPLANTE UTILIZADO (AOS 60 DIAS DE CULTIVO) E CONVERSÃO DE CALOS (AOS 90 DIAS DE CULTIVO) DE CANA-DE-AÇÚCAR, VARIEDADE RB036066.56
- TABELA 2 - PORCENTAGEM DE EXPLANTES FOLIARES COM CALOS, CULTIVADOS EM MEIO MS, EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE 2,4-D E DO TIPO DE EXPLANTE UTILIZADO (AOS 60 DIAS DE CULTIVO) E CONVERSÃO DE CALOS (AOS 90 DIAS DE CULTIVO) DE CANA-DE-AÇÚCAR, VARIEDADE RB036088.57
- TABELA 3 - PORCENTAGEM DE EXPLANTES FOLIARES COM CALOS, CULTIVADOS EM MEIO MS, EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE 2,4-D E DO TIPO DE EXPLANTE UTILIZADO (AOS 60 DIAS DE CULTIVO) E CONVERSÃO DE CALOS (AOS 90 DIAS DE CULTIVO) DE CANA-DE-AÇÚCAR DA VARIEDADE RB036091.58
- TABELA 4 - TAXA DE SOBREVIVÊNCIA DAS VARIEDADES RB036091, RB036066 E RB036088 EM FUNÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA PARA ENRAIZAMENTO. CULTIVO NOS MEIOS DE CULTURA MS, MS COM ADIÇÃO DE 70G L-1 DE SACAROSE, MS COM 2,46 µM DE AIB E MS COM METADE DOS SAIS.64

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ABA	- Ácido Abscísico
CE	- Calos Embriogênicos
Ct	- Ciclo de <i>threshold</i>
EROS	- Espécies Reativas ao Oxigênio
ES	- Embriogênese Somática
ET	- Eficiência de transformação
ET _(EMS)	- Eficiência de transformação considerando plantas selecionada em meio seletivo
GLU	- Glutamato
GSA	- Glutamato Semialdeído
MDA	- Malondialdeído
OAT	- Ornitina- δ -aminotransferase
ORN	- Ornitina
P5C	- Pirrolina-5-carboxilato
P5CDH	- Prolina-5-carboxylase desidrogenase
P5CS	- Pirrolina-5-carboxilase sintase
PDH	- Prolina desidrogenase
T _m	- Temperatura de <i>melting</i>
2,4 – D	- 2,4-diclorofenoxiacético

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. CANA-DE-AÇÚCAR.....	15
2.2. ESTRESSES ABIÓTICOS	16
2.2.1. ESTRESSE HÍDRICO EM CANA-DE-AÇÚCAR.....	17
2.2.2. MECANISMOS DE DEFESA E ACLIMATAÇÃO AO DÉFICIT HÍDRICO	20
2.3. PROLINA.....	23
2.4. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA.....	28
2.4.1. BIOBALÍSTICA.....	31
2.5. EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA	33
REFERÊNCIAS.....	36
3 CAPÍTULO I: REGENERAÇÃO DAS VARIEDADES RB036066, RB036088 E RB036091 DE CANA-DE-AÇÚCAR POR MEIO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA 49	
RESUMO	49
ABSTRACT	50
3.1. INTRODUÇÃO	51
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	52
3.2.1. Local de realização dos experimentos	52
3.2.2. Condições gerais de cultura <i>in vitro</i>	52
3.2.3. Embriogênese somática	53
3.2.4. Análise citoquímica	55
3.2.5. Multiplicação.....	55
3.2.6. Enraizamento e aclimatização	55
3.2.7. Análise estatística	55
3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
3.4.1. Embriogênese somática	56
3.4.2. Enraizamento	62
3.6. CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS.....	65

4 CAPÍTULO II: TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE CANA-DE-AÇÚCAR, VARIEDADE RB036088, UTILIZANDO O GENE <i>P5CS</i> PARA TOLERÂNCIA AO ESTRESSE HÍDRICO.....	70
RESUMO	70
ABSTRACT	71
4.1. INTRODUÇÃO	72
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	74
4.2.1. Material vegetal e condições gerais de cultura	74
4.2.2. Plasmídeo pJ107	75
4.2.3. Transformação genética	75
4.2.4. Análise de integração do transgene	76
4.2.5. Análise da expressão do transgene.....	76
4.2.6. Quantificação de prolina	77
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
4.3.1. Transformação Genética	78
4.3.2. Integração do Transgene.....	81
4.3.3. Análise da expressão do transgene.....	81
4.3.4. Quantificação da Prolina.....	84
4.4. CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS.....	87
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	93
REFERÊNCIAS.....	94

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma cultura milenar e sempre foi considerada de grande valor por gerar subprodutos importantes, como o açúcar. No Brasil ela ocupa local de destaque na balança comercial. A exportação apenas de açúcar, proveniente da cana, gerou um faturamento de 4,4 bilhões de dólares no ano de 2019 levando o país a continuar na liderança de produção de cana e derivados (COMEXSTAT, 2020).

A área plantada de cana-de-açúcar no Brasil somou mais de 8 milhões de hectares, representando uma produção de 642 milhões de toneladas de cana colhida na safra 2019/2020 (CONAB, 2020b). Ainda segundo os dados da CONAB, a safra 2019/2020 teve um crescimento de 3,6% em relação à safra anterior. É importante ressaltar que a área colhida foi menor do que a da safra de 2018/2019, com uma redução de 1,7%, ou seja, a produtividade foi superior.

A queda na produtividade da safra 2018/2019 foi um reflexo das alterações climáticas durante o ano de 2018 e início de 2019 nas principais regiões produtoras. Os baixos índices pluviométricos no início do ciclo atrasaram o crescimento das plantas e a estiagem prolongada ao final do ciclo antecipou a colheita, as plantas foram colhidas com ciclo de maturação mais curto e menor peso que o desejado, resultando em menor rendimento (CONAB, 2018).

Além da queda na produtividade, o déficit hídrico impede a expansão da cultura para novas áreas que apresentem longos períodos de estiagem ou irregularidade de chuvas (MARIN; NASSIF, 2013). Estes motivos evidenciam a necessidade da seleção de variedades mais tolerantes ao estresse hídrico.

Estudos sobre este assunto têm sido desenvolvidas ao longo dos anos, com os pesquisadores buscando entender como a cana-de-açúcar se comporta em ambientes de estresse. Khonghintaisong et al. (2018) observaram que plantas de cana, tolerantes a seca, aumentaram a razão raiz/parte aérea e alteraram a partição dos assimilados como forma de manter a biomassa das plantas. Já Batista et al. (2015), evidenciaram que o estresse hídrico moderado (-60 kPa) promoveu reduções severas nas taxas de alongação do colmo para as variedades RB867515, RB928064, RB855453 e RB92579. Seguindo a mesma linha, Araújo et al. (2016), demonstraram que o déficit hídrico de 37,76 mm parece ser o limite crítico da falta de água no solo, a partir disso a produtividade de colmos começa a ser afetada. Outra linha, são os trabalhos que buscam aumentar a tolerância das plantas como, Dinh et al. (2017)

sugerem que a maior eficiência do uso do nitrogênio pode auxiliar na tolerância ao estresse hídrico, e Aguiar et al. (2016) constataram que o uso de ácidos húmicos e bactérias diazotróficas auxiliam na recuperação do estresse hídrico e induzem a preservação do potencial hídrico (Ψ), respectivamente.

As pesquisas para compreensão dos efeitos do estresse hídrico e formas de aumentar a tolerância auxiliam no manejo da cultura para superar os períodos de estiagem. Porém, não resolve o problema, por isso os programas de melhoramento continuam na busca por variedades tolerantes ao estresse por meio de cruzamentos e transformação genética.

O melhoramento tem como ferramenta a transformação genética, que permite a inserção de um gene externo ao genoma da planta. Em cana-de-açúcar os genes *AVP1* (KUMAR et al., 2014), *DREB2A CA* (REIS et al., 2014), *PDH45* (AUGUSTINE et al., 2015a), *HSP70* (AUGUSTINE et al., 2015b) e *P5CS* (JAIN et al., 2015) são alguns dos que já foram inseridos com sucesso para aumento da tolerância ao déficit hídrico. Cada um destes genes atua de forma diferente no incremento da tolerância ao estresse hídrico. O gene *P5CS*, por exemplo, atua na biossíntese de prolina, molécula que inibe o acúmulo de espécies reativas ao oxigênio (ROS) nas células, diminuindo assim as consequências da falta de água. O acúmulo de prolina em cana-de-açúcar é um dos indicadores eficazes na seleção de variedades tolerantes a seca (JAIN et al., 2015; MOLINARI et al., 2006).

O Brasil já aprovou quatro variedades transgênicas para plantio comercial (CTC9003BT, CTC9001BT, CTC515BT, CTC20BT) e a área plantada, em 2019, foi de aproximadamente 18.000 hectares. Além do Brasil, a Indonésia também possui 2.000 hectares de cana-de-açúcar transgênica (NXI-4T) tolerante ao estresse hídrico, liberada para plantio comercial pelo Ministério da Agricultura da Indonésia em 2018 (ISAAA, 2019; LAJOLO; YOKOYAMA; CHEAVEGATTI GIANOTTO, 2021; CTC, 2021).

Para o êxito da transformação genética diversos são os fatores envolvidos como, genótipo da planta, método de transformação, vetor utilizado, condições de cultivo, explante escolhido e domínio das técnicas utilizadas (KRISHNAN; MOHAN, 2014; FERREIRA et al., 2017). Em cana-de-açúcar, a embriogênese somática é uma das formas de viabilizar a inserção de um novo gene nas plantas (LAKSHMANAN et al., 2005). O uso de massas embriogênicas, de cana-de-açúcar, têm se mostrado eficiente para transferência de genes, seleção e regeneração de plantas transgênicas

e é uma das formas preferencialmente utilizadas, tanto para o método de bombardeamento de micropartículas quanto por *Agrobacterium tumefaciens* (BASNAYAKE et al., 2011; JOYCE et al., 2010).

As duas técnicas de transformação são eficientes, porém a mais utilizada para cana-de-açúcar é a biobalística. Por se tratar de uma monocotiledônea a *A. tumefaciens* tem pouca afinidade pela cultura. A transformação por bombardeamento é eficiente e largamente utilizada, além de ser capaz de produzir vários eventos transgênicos por tiro (BOWER., et al., 1992; BASNAYAKE et al., 2011).

Assim, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de protocolos de embriogênese somática para as variedades RB036088, RB036091 e RB036066 e a integração do gene *P5CS* na variedade RB036088 por meio da biobalística.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CANA-DE-AÇÚCAR

A cana-de-açúcar é uma importante fonte de alimentos e energia. Ela compõe a economia de vários países, como Brasil, Índia e Tailândia, é fonte de matéria prima para açúcar, etanol e outros derivados, além de ser responsável por gerar empregos diretos e indiretos (MOORE et al., 2014; OECD/FAO, 2019).

Originária de ambientes tropicais, a cana-de-açúcar se adaptou muito bem ao clima do Brasil, tornando o país o maior produtor mundial da cultura, seguido por Índia, China e Tailândia (FAOSTAT, 2020). A tradição brasileira no cultivo da cana-de-açúcar é muito antiga, os primeiros engenhos registrados são datados de 1.530 e desde então houve uma grande expansão do seu cultivo (BRAIBANTE, 2013). Atualmente, a área plantada é de 8.442 mil hectares e a produtividade média é de 76 ton ha⁻¹. A sua fácil adaptação a diferentes ambientes proporcionou o seu cultivo em 20 dos 27 estados brasileiros (CONAB, 2020a).

A cana-de-açúcar é capaz de sintetizar, transportar e acumular altas concentrações de açúcar em seus colmos, é reconhecida como uma das culturas mais eficientes do mundo na conversão de energia solar em energia química como sacarose e biomassa (MOORE et al., 2014; RAE et al., 2014). Por possuir metabolismo C₄, é uma planta que apresenta elevada taxa fotossintética e é eficiente na utilização do gás-carbônico (MARIN; NASSIF, 2013).

Gramínea, semi-perene, pertencente à família Poaceae, a cana-de-açúcar é do gênero *Saccharum L.*, que abrange as espécies *S. spontaneum L.*, *S. robustum*, *S. officinarum L.*, *S. barberi*, *S. sinensis*, *S. edule* (MOORE et al., 2014, CARVALHO; FURTADO, 2013). As canas cultivadas atualmente são híbridos interespecíficos entre *Saccharum officinarum L.* e *S. spontaneum L.* (AMARAL et al., 2015). O complexo *Saccharum* é composto pelos gêneros *Saccharum*, *Erianthus*, *Miscanthus*, *Narenga* e *Sclerostachya* todos com origem comum, intercruzáveis, com altos níveis de ploidia e frequente desbalanço de cromossomos (aneuploidias), caracterizando um genoma altamente complexo, com número poliploide de cromossomos variando de 70 a 120 (D'HONT et al., 1996; LAKSHMANAN et al., 2005; AMARAL et al., 2015).

Por apresentar um genoma altamente complexo, o melhoramento genético não é simples, levando em média de 10 a 15 anos para liberação de uma nova variedade no mercado (LAKSHMANAN et al., 2005; MORAIS et al., 2015). Para a seleção de clones, características como: produtividade, resistência a pragas e doenças, época de maturação, despalha, adaptabilidade e tolerância a estresses abióticos são avaliadas e desejadas (MORAIS et al., 2015).

Variedades com adaptabilidade e tolerância/resistência a estresses abióticos são almejadas, uma vez que possibilitam a expansão do cultivo para áreas marginais, ampliando assim a produção de cana-de-açúcar no país (CARVALHO; FURTADO, 2013; CAI et al., 2015).

2.2. ESTRESSES ABIÓTICOS

As condições ideais de crescimento de uma planta variam de acordo com cada espécie, elas são definidas como as que permitem o crescimento e o máximo potencial reprodutivo. Porém, muitas vezes, as plantas são cultivadas em ambientes adversos com restrições ou superexposições (de água, luz, nutrientes, temperatura, entre outros), os chamados estresses abióticos (TAIZ et al., 2017).

O estresse abiótico, quando persistente e ou severo, leva a danos às culturas, perda de produtividade, atraso no crescimento e até a morte das plantas (MITTLER, 2006; OECD/FAO, 2019). Eventos extremos como seca e alagamentos acarretaram perdas de até 50% em culturas do Canadá. Nos Estados Unidos estresses abióticos levaram a perdas de 2,085 trilhões de dólares entre os anos de 1980 e 2021. No Brasil os eventos extremos, de 2010 a 2018, somaram mais de 306 mil coberturas deferidas

pelo Programa de Garantia da Atividade Agropecuária (Proagro) (LAMAOUUI et al., 2018; CARVALHO et al, 2020; NOAA, 2021).

Dentre os estresses abióticos, o hídrico é um dos principais, sendo responsável por grandes perdas na agricultura. A seca histórica dos Estados Unidos no ano de 2012, causou perdas de 30 bilhões de dólares. A cultura do sorgo teve perdas de mais de 20% da safra (RIPPEY, 2015; NOAA, 2021). No Brasil os eventos de seca foram responsáveis por 54% das indenizações pagas por seguro rural entre os anos de 2006 a 2021 somando mais de 3 bilhões de reais (MAPA, 2021).

Devido ao impacto socioeconômico do estresse hídrico, estudos na área são de grande importância, para ajudar a mitigar os seus efeitos, uma vez que as projeções são de escassez de água e aumento na temperatura para os próximos anos (IPCC, 2018).

2.2.1. ESTRESSE HÍDRICO EM CANA-DE-AÇÚCAR

A água tem papel crucial nos processos fisiológicos das plantas. Processos como fotossíntese, respiração e crescimento estão intimamente ligados a disponibilidade hídrica nas folhas (HSIAO, 1973). As respostas fisiológicas e morfológicas das plantas a baixa disponibilidade hídrica vão depender da variedade, da duração (rápido ou gradual) e da intensidade do estresse (FERREIRA et al., 2017).

O impacto da restrição hídrica severa afeta a cana-de-açúcar como um todo (FIGURA 1), porém a sensibilidade vai variar de acordo o estágio de desenvolvimento da planta. As fases fenológicas são divididas em quatro: germinação, perfilhamento, crescimento vegetativo e maturação (DOORENBOS; KASSAM, 1979; AUDE, 1993). As fases mais sensíveis ao estresse hídrico são perfilhamento e crescimento vegetativo (DOORENBOS; KASSAM, 1979; INMAN-BAMBER; SMITH, 2005; RODRIGUES et al., 2012). Porém, quando há seca no período de brotação, a emissão de raízes fica prejudicada e pode ocorrer morte das gemas, causando falhas no campo, além disso o ataque de pragas pode ser potencializado (CASA GRANDE; VASCONCELOS, 2008; LAKSHMANAN; ROBINSON, 2014).

A formação de um bom sistema radicular eleva as chances da cana-de-açúcar sobreviver a períodos críticos de seca, já que, a elas cabe o papel de absorção de água (LAKSHMANAN; ROBINSON, 2014). Elas também são responsáveis pela

percepção da limitação hídrica. Quando acontece, o sistema radicular envia sinais que irão desencadear mudanças, na concentração de reguladores, pH e distribuição iônica (RODRIGUES et al., 2012). Estes sinais alteram as concentrações de ácido abscísico (ABA) que se elevam e provocam o fechamento estomático (RODRIGUES et al., 2011; TAIZ et al., 2017). Este processo foi evidenciado em cana-de-açúcar na avaliação da expressão gênica durante o estresse hídrico. Foi demonstrado a presença de duas proteínas ABA-induzível durante a restrição hídrica na variedade SP83-2847 (RODRIGUES et al., 2011).

FIGURA 1 - ESQUEMA DOS MECANISMOS EM RESPOSTA À SECA NA CANA-DE-AÇÚCAR



FONTE: Adaptado de FERREIRA et al., 2017

Além disso, o ABA é responsável por um aumento marcante na razão raiz:parte aérea (TAIZ et al., 2017). Em trabalho realizado por Khonghintaisong et al. (2017) foi

demonstrado que em situação de estresse hídrico a cana-de-açúcar segue a mesma tendência, com aumento da razão raízes:parte aérea e alteração da partição dos assimilados como forma de manter a biomassa das plantas. Battie Laclau e Laclau (2009) avaliaram a diferença do desenvolvimento radicular de cana-de-açúcar, variedade RB72454, em sequeiro e cultivo irrigado. Foi observado um aumento de 49% de intercessões radiculares e uma distribuição mais homogênea das raízes no cultivo de sequeiro do que no irrigado. Também foi observado que a profundidade máxima das raízes foi de 4,70 m e 4,25 m para os cultivos em sequeiro e irrigado, respectivamente, 332 dias após o plantio.

Com o fechamento estomático as trocas gasosas são reduzidas, a fotossíntese é afetada e há redução da expansão celular (TAIZ et al., 2017). Assim, o alongamento dos colmos de cana-de-açúcar é prejudicado, esta é a alteração morfológica mais sensível da cultura. Há, também, enrolamento foliar e limitação na produção de folhas novas (INMAN-BAMBER; SMITH, 2005; LAKSHMANAN; ROBINSON, 2014; FERREIRA et al., 2017). Como foi demonstrado por Batista et al. (2015), que apontaram reduções de 60% nas taxas de alongação do colmo para as variedades RB867515, RB928064, RB855453 e RB92579 em estresse hídrico moderado (-60 kPa). Machado et al. (2009) observaram uma redução 25% na quantidade de folhas verdes decorrente do estresse hídrico para as variedades de cana-de-açúcar IACSP 94-2094 e IACSP 96-2042.

A redução da taxa fotossintética e consequente diminuição da alongação do colmo prejudicam a produtividade da cultura (LAKSHMANAN; ROBINSON, 2014). Isto porquê, o comprimento dos internódios e altura das plantas são mais sensíveis ao estresse hídrico do que o diâmetro dos colmos. As plantas com internódios longos e produtivos melhoram o desempenho industrial da cana-de-açúcar no beneficiamento (DOORENBOS; KASSAM, 1979; PIRES; ARRUDA; SAKI, 2008).

Ademais, a baixa umidade do solo pode desencadear a maturação precoce da cana-de-açúcar (KEATING et al., 1999). As plantas aceleram o ciclo e iniciam o processo de translocação de açúcares para os órgãos de armazenamento antes do previsto (KEATING et al., 1999; MARAFRON, 2012). Deste modo, a colheita é realizada com baixo crescimento, internódios curtos e falta de peso dos colmos, acarretando em perdas de produtividade. Assim como ocorreu na safra 2018/2019, com a irregularidade de chuvas a colheita no Sudeste foi antecipada devido a maturação precoce e gerou perdas de mais de 21 milhões toneladas (CONAB, 2018).

Prevenindo perdas de grande magnitude, a Austrália irriga ~60% dos cultivos de cana-de-açúcar e mesmo assim tem custos de A\$ 260 milhões por ano com perdas na produção causadas pelo estresse hídrico o que impõe limitações na expansão da cultura no país (BASBAYAKE et al., 2012; INMAN-BAMBER et al., 2012).

O impacto do estresse hídrico na cana-de-açúcar gera grandes prejuízos econômicos, visto que, a água está diretamente relacionada ao acúmulo de sacarose, uma vez que a razão da conversão de água presente no colmo para gerar sacarose é de 1:1 (KEATING et al., 1999). Desta forma, entender os meios de defesa das plantas e investir no melhoramento genético visando obter variedades tolerantes ao estresse hídrico é indispensável nos programas de melhoramento.

2.2.2. MECANISMOS DE DEFESA E ACLIMATAÇÃO AO DÉFICIT HÍDRICO

As plantas possuem diferentes mecanismos de prevenção, adaptação e tolerância a seca. Em condições adversas elas são capazes de otimizar os processos fisiológicos, ativar genes responsivos ao estresse e sintetizar diversas proteínas funcionais para superar o período crítico (YOU; CHAN, 2015; BASU et al., 2016). As palavras resistência e tolerância costumam ser utilizadas como sinônimos, porém não há resistência absoluta ao estresse hídrico sem prejuízo ao crescimento ou a outras funções de qualquer planta ou cultura (FERREIRA et al., 2017).

Os transtornos causados no metabolismo vegetal pelo estresse abiótico originam grupos intermediários tóxicos, o mais comum é o das espécies reativas ao oxigênio (EROS) como, superóxido (O_2^-), oxigênio singlete (1O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila (OH^-) (TAIZ et al. 2017; KAUR; ASTHIR, 2020). Em condições de crescimento as EROS são produzidas em baixo nível por mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos. Porém, quando há alguma alteração nas rotas metabólicas, elétrons de alta energia são transferidos para o oxigênio molecular formando as EROS em quantidade excessiva (MILLER et al., 2010; YOU; CHAN, 2015).

As EROS em excesso nos tecidos celulares são altamente prejudiciais. Elas são capazes de causar interrupção no crescimento das plantas por provocar modificações oxidativas de lipídios de membrana, aminoácidos, proteínas e DNA, afetando funções vitais podendo levar a disfunções metabólicas permanentes e à

morte da planta. (AJUM et al., 2015; HOSSAIN et al., 2015; TAIZ et al., 2017). Este distúrbio causado pelo desequilíbrio de EROS é conhecido como estresse oxidativo (AJUM et al., 2015).

Em quantidades reduzidas as EROS funcionam como sinalizadoras do estresse, levando a ativação de mecanismos de defesa e de aclimação (HOSSAIN et al., 2015). Portanto, a toxicidade de EROS vai depender da concentração acumulada e da duração do estresse (MILLER et al., 2010; AJUM et al., 2015). Geralmente a aclimação é alcançada pela manutenção de um nível mais baixo de H₂O₂ e redução da peroxidação lipídica. Plantas tolerantes ao estresse costumam ter este conteúdo reduzido quando comparado a plantas sensíveis (HOSSAIN et al., 2015; KAUR; ASTHIR, 2020).

As sinalizações realizadas pelas EROS desencadeiam diferentes mecanismos de defesa, como a síntese de ABA e prolina (KAUR; ASTHIR, 2020). O ABA é conhecido como o hormônio vegetal do estresse, uma vez que está envolvido na aclimação de vários estresses como osmótico, salino e o de baixa temperatura (TAIZ et al., 2017).

Em situação de estresse hídrico os níveis endógenos de ABA se elevam. Li e colaboradores (2016) observaram um incremento de 72% durante estresse hídrico severo em cana-de-açúcar. Além de interferir diretamente no fechamento estomático, redução da área foliar e proporção raiz:parte aérea, o ABA desempenha um papel de mediador chave em resposta ao estresse celular nas plantas (HIMMELBACH et al., 2003; FERREIRA et al., 2017). Ele é responsável por mediar várias respostas na adaptação a condições desfavoráveis (RAJASHEKER et al., 2019).

A aplicação exógena de ABA tem se mostrado eficiente na indução da aclimação e tolerância a condições de estresse hídrico. Kaur e Asthir (2020) observaram que os genótipos de trigo Gladius e Drysdale, em situação de déficit hídrico, apresentaram uma influência positiva de aproximadamente 20% no comprimento das brotações e de pelo menos 3% na biomassa quando submetidas a aplicação exógena de 10 µM de ABA. Mega et al. (2019) superexpressaram receptores de ABA, aumentando a sensibilidade do trigo ao regulador e notaram que houve um incremento de 25% na eficiência de uso da água e uma redução de 20% no consumo de água.

Os genes responsivos ao ABA possuem em comum um cis-elemento presente na região promotora conhecido como ABRE (ABA-Responsive Element) que está

relacionado a respostas a desidratação (SHANKER et al., 2013; FERREIRA et al., 2017). Estes genes também contém um elemento alternativo de regulação conhecido por DRE (Dehydration Response Element), um conjunto de proteínas independentes de ABA que regulam a transcrição induzida pelo frio e pela desidratação (REIS et al., 2014). Assim, os genes regulados pelo estresse osmótico podem ser ABA-dependentes ou ABA-independentes (TAIZ et al., 2017).

Os receptores ABA (proteínas PYR/PYL/RCAR) são centrais na atuação do papel de ABA nas relações hídricas. São essas proteínas que inibem a atividade das proteínas fosfatase 2C (PP2C), reguladoras negativas da sinalização de ABA. Com a inibição da regulação negativa de ABA (PP2Cs), as quinases SnRK2 são fosforiladas e se tornam ativas (QUIN et al., 2011; MEGA et al., 2019; RAJASHEKER et al., 2019). As SnRK2, por sua vez, fosforilam os fatores de transcrição AREB/ABF que se ligam diretamente aos ABREs localizado nos promotores dos genes responsivos a ABA (QIN et al., 2011). SnRK2s, podem fosforilar proteínas a jusante, como canais iônicos, NADPH oxidases e outros, assim ABA pode provocar a ativação de diferentes eventos (RAJASHEKER et al., 2019).

Trabalhos têm mostrado relação entre acúmulo de ABA e a síntese de prolina. Kaur e Asthir (2020), trabalhando com germinação de sementes de trigo expostas ao estresse hídrico, relataram que a aplicação exógena de ABA regulou positivamente o acúmulo de prolina quando comparado ao tratamento controle. Estudos com mutantes deficientes em ABA expostos a aplicação exógena de ABA, indicaram que o acúmulo de prolina, sob estresse, é parcialmente regulado por ABA, mas ABA aplicado na ausência de estresse é insuficiente para induzir altos níveis de prolina (VERSLUES; SHARMA, 2010). A hipótese de que ABA estimula a produção de glutamato, precursor da prolina, e conseqüentemente eleva os níveis de prolina foi levantada por Stewart (1980). Outra possibilidade é de que o ABA influencia positivamente na regulação do gene P5CS1 durante o estresse osmótico, acarretando então no acúmulo de prolina (RAJASHEKER et al., 2019; SHRESTHA et al., 2021).

O acúmulo de prolina é uma das primeiras respostas ao estresse e a sua atuação na aclimatação e tolerância a adversidades abióticas é de fundamental importância para a sobrevivência plantas submetidas ao estresse (RAJASHEKER et al., 2019; MEGA et al., 2019; SHRESTHA et al., 2021).

2.3. PROLINA

A prolina possui propriedades únicas e se distingue de outros aminoácidos de diferentes maneiras, por exemplo, é o único dos aminoácidos proteínogênicos em que o grupo α -amino está presente como uma amina secundária (VERSLUES; SHARMA, 2010). Devido a sua estrutura cíclica, a prolina leva a estabilização ou desestabilização de estruturas secundárias de conformação proteica (LEHMANN et al., 2010). Além de seu papel no metabolismo primário como um componente de proteínas, a prolina livre é um dos solutos mais amplamente distribuídos que se acumulam em diferentes organismos durante condições ambientais adversas. Este fenômeno é observado em plantas, bactérias, protozoários e invertebrados marinhos. Nas plantas também está presente nas infecções por patógenos, deficiência de nutrientes e no excesso de radiação UV (STEWART, 1980; LEHMANN et al., 2010; LIANG et al., 2013, DAR et al., 2016, SIDDIQUE, KANPAL; KUMAR, 2018).

As plantas em situação de estresse apresentam uma rápida elevação nos níveis de prolina. Para as variedades de cana-de-açúcar RB72454 e RB92579, durante estresse hídrico, o incremento foi de 623% e 1657%, respectivamente, em relação ao tratamento controle enquanto o osmorregulador glicina betaína, apresentou incremento de 28% apenas para a variedade RB92579 (JÚNIOR et al., 2020). O aumento tão expressivo de prolina durante o estresse osmótico pode ser explicado em parte por suas propriedades químicas básicas. A prolina é um dos aminoácidos mais solúveis em água e existe na maior parte do tempo como moléculas neutras permitindo se acumular em altas concentrações sem interferir na estrutura celular (VERSLUES; SHARMA, 2010).

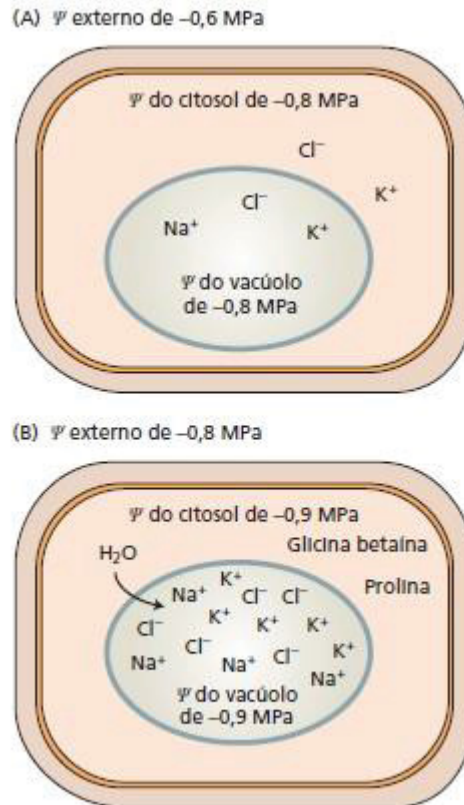
A diferença no acúmulo de prolina quando comparado a outros metabólitos e a forma como seu metabolismo pode ser modificado para melhorar a tolerância à seca, são pontos importantes para a biologia do estresse em plantas (BHASKARA; YANG; VERSLUES, 2015). Ela pode ser considerada um aminoácido multifuncional, já que aparenta ter diferentes papéis em condições de estresse, como estabilização de proteínas, membranas e estruturas subcelulares, homeostase energética, proteção das funções celulares pela eliminação de EROS e como osmorregulador (NATARAJAN; BECKER, 2013; KAUR; ASTHIR, 2015; LIANG et al., 2013).

A função de ajuste osmótico das células vegetais em condições de estresse hídrico é uma adaptação fundamental para manter o turgor celular. O que,

consequentemente, mitiga os danos a diferentes sistemas e permite uma melhor recuperação pós-seca (BLUM, 2017; JÚNIOR et al., 2020).

O equilíbrio do potencial hídrico (Ψ) é mantido em condições normais com o Ψ do citosol e do vacúolo levemente mais baixo do que o ambiente circundante, permitindo assim a entrada de água na célula (TAIZ et al., 2017). Em condições de estresse hídrico o Ψ do ambiente externo tende a diminuir (FIGURA 2). Para manter o turgor, a célula realiza o ajuste osmótico, concentrando solutos no vacúolo e no citosol. No vacúolo são acumulados solutos como, açúcares, ácidos orgânicos e íons, já no citosol há acúmulo de solutos compatíveis (prolina, glicina betaína e sorbitol) (VERSLUES; SHARMA, 2010). Os solutos compatíveis são compostos orgânicos de baixo peso molecular, altamente solúveis, osmoticamente ativos nas células, que em altas concentrações não são tóxicos, diferentemente dos solutos acumulados no vacúolo (HAYAT et al., 2012; TAIZ et al., 2017). O acúmulo de prolina resulta em um aumento na osmolaridade celular que impulsiona o influxo de água ou reduz seu efluxo, proporcionando assim o potencial de pressão necessário para a manutenção celular e a aclimação ao estresse (VERSLUES; SHARMA, 2010; KAUR; ASTHIR., 2015).

FIGURA 2 - OSMORREGULAÇÃO CELULAR DURANTE ESTRESSE OSMÓTICO



FONTE: Taiz et al., 2017

Outra função de destaque da prolina é a de proteção das funções celulares pela eliminação de EROS (MILNER; McCLELLAN; WOOD, 1987). As plantas possuem enzimas especializadas para a inativação de EROS, como superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, catalase, entre outras (TAIZ et al., 2017). Porém, em condições de estresse a produção de EROS pode exceder o potencial antioxidante das enzimas especializadas (HAYAT et al., 2012). Então, outros antioxidantes não enzimáticos são ativados, como a prolina (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014).

A prolina é um eficiente eliminador de $\cdot\text{OH}$ e $^1\text{O}_2$, pelo menos dois radicais OH são consumidos por molécula de prolina, inibindo assim, a peroxidação lipídica e demais prejuízos causados pelo excesso de EROS (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014, SIGNORELLI et al., 2014). Trabalhos com a aplicação exógena de prolina apontam para a redução no conteúdo de EROS e aumento de enzimas antioxidantes, sugerindo que além de reduzir EROS, ela pode atuar na regulação das enzimas antioxidantes

(HOQUE et al., 2007; DE FREITAS et al., 2018; ZOUARI et al., 2019; HANIF et al., 2021).

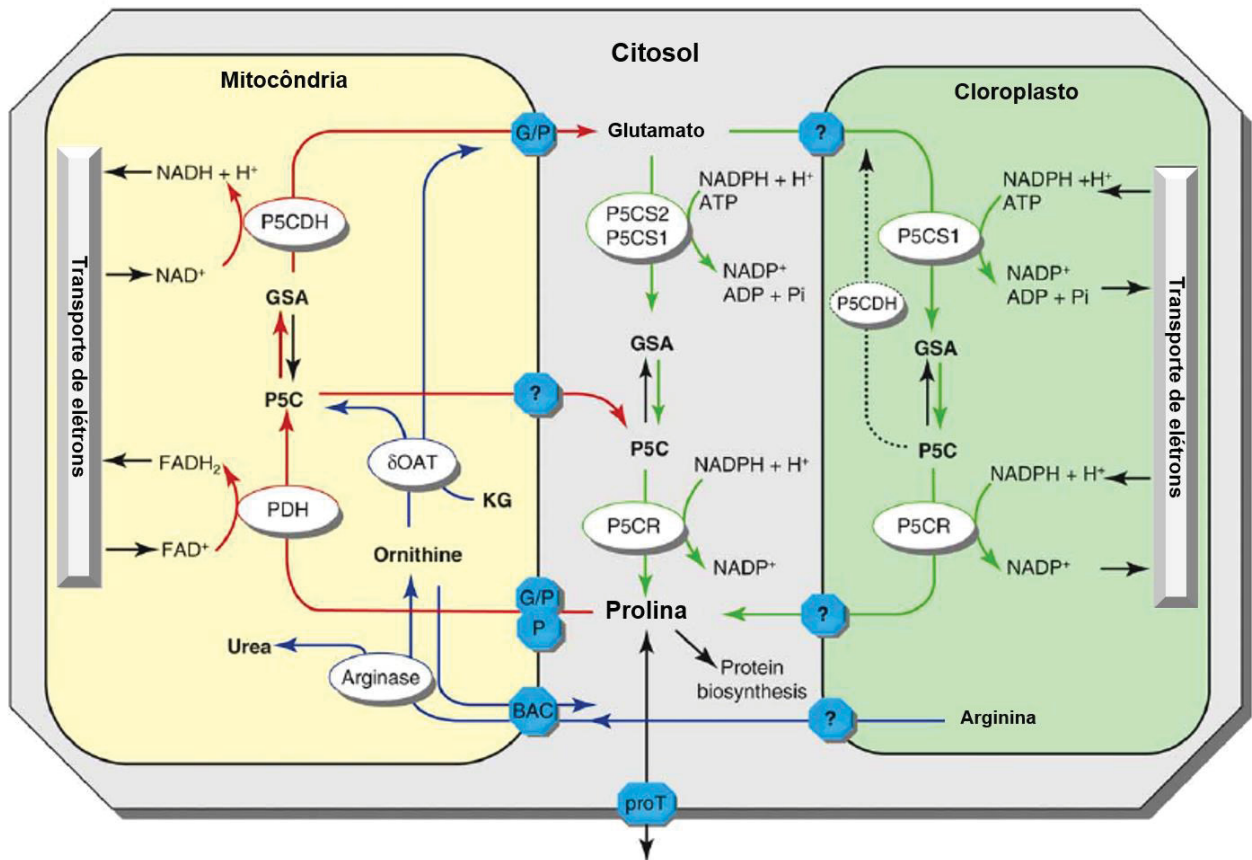
Além da função osmoprotetora, os solutos compatíveis proporcionam uma fonte de carbono e nitrogênio para a célula quando as condições retomam ao normal (TAIZ et al., 2017). Hong et al. (2000) concluem que a função de eliminação de EROS pela prolina pode ser mais importante na superação do estresse do que como osmorregulador.

Os níveis de prolina nas plantas são regulados pelo balanço entre a biossíntese, catabolismo e transporte entre células e diferentes compartimentos (DAR et al., 2015). A sua síntese pode acontecer por duas vias diferentes, pelo glutamato ou pela ornitina (JÚNIOR et al, 2020). A via do glutamato é a principal e a mais utilizada durante o estresse osmótico (HAYAT et al., 2012). Ela é principalmente regulada pela transcrição de genes que codificam as enzimas chave pirrolina-5-carboxilase sintase (P5CS) e a pirrolina-5-carboxilase redutase (P5CR) (VERSLUES; SHARMA, 2010).

Na biossíntese de prolina (FIGURA 3) pela via principal, o glutamato (GLU) é reduzido a glutamato-semialdeído (GSA) pela P5CS e espontaneamente convertido a pirrolina-5-carboxilato (P5C). Posteriormente, P5C é reduzido por P5CR para prolina, esta via acontece no citoplasma e/ou cloroplasto, em condição de estresse a biossíntese acontece preferencialmente no cloroplasto (SZABADOS; SAVOURÉ, 2010; VERSLUES; SHARMA, 2010). Com retomada da hidratação celular o catabolismo da prolina é iniciado pela transcrição da prolina desidrogenase (PDH) (HAYAT et al., 2012). Esta etapa ocorre na mitocôndria via PDH e Δ^1 -pirrolina-5-prolina-5-carboxilase desidrogenase (P5CDH). Prolina é oxidada por PDH a P5C e P5C é convertido a GLU por P5CDH. (SZABADOS; SAVOURÉ, 2010; REJEB; ABDELLY; SAVOURÉ, 2014).

Outra possibilidade para biossíntese de prolina é pela via ornitina (ORN), normalmente ela ocorre em condições de ótima disponibilidade de nitrogênio e no desenvolvimento de mudas (DAR et al., 2016). A ORN é transaminada em P5C pela ornitina- δ -aminotransferase (OAT). Aparentemente esta via predomina na mitocôndria com alto suprimento de nitrogênio (KAUR; ASTHIR, 2015).

FIGURA 3 – AS PRINCIPAIS VIAS DO METABOLISMO DA PROLINA



FONTE: Adaptado SZABADOS e SAVOURÉ, 2010.

LEGENDA: As linhas verdes caracterizam a via de biossíntese de prolina por glutamato (GLU), as linhas vermelhas a via catabólica e as linhas azuis a via de biossíntese por ornitina (ORN). As enzimas são representadas como elipses e as proteínas transportadoras como octógonos azuis.

Em condição de estresse hídrico o acúmulo de prolina está correlacionado com a atividade da enzima reguladora P5CS, que é uma enzima bifuncional, com dois domínios que funcionam como enzimas quinase e desidrogenase, codificada por dois genes P5CS homólogos (KAUR; ASTHIR, 2015; AMINI; GHOBADI; YAMCHI, 2015). Os dois genes compartilham um alto nível de homologia de sequências, porém são regulados de maneiras diferentes (SZABADOS et al., 1998; SZABADOS; SAVOURÉ, 2010). Enquanto P5CS1 é induzido em situações de estresse, P5CS2 é ativado para divisão meristemática, brotação, enraizamento, inflorescência, indicando ser um gene de manutenção (LIANG et al., 2013; REJEB; ABDELLY; SAVOURÉ, 2014; BHASKARA; YANG; VERSLUES, 2015).

A expressão de P5CS pode ser induzida por fatores ambientais e por fitohormônios, porém a via de sinalização para indução não é completamente conhecida (AMINI; GHOBADI; YAMCHI, 2015; RAJASHEKER et al., 2019). A

transcrição e regulação de mRNA *AtP5CS1* está bem correlacionada com o acúmulo de prolina, em trabalhos com *Arabidopsis thaliana*, plantas expostas a situações de estresse luminoso, hídrico e salino apresentaram o mesmo comportamento, aumento de *AtP5CS1* e prolina (SZABADOS et al., 1998; AMINI; GHOBADI; YAMCHI, 2015; RAJASHEKER et al., 2019). Outro fator relacionado a indução de *ATP5CS1* é o ABA, que participa ativamente na resposta ao estresse vegetal, evidências apontam que tanto a via ABA-dependente quanto a ABA-independente estão relacionados a indução de P5CS (RAJASHEKER et al., 2019; SHRESTHA et al., 2021).

A enzima P5CS é peça chave na síntese de prolina e na busca por compreender melhor a sua função, o gene P5CS foi clonado a primeira vez de *Vigna aconitifolia* por complementação (HU et al., 1992). Posteriormente foi incorporado em diferentes culturas como: tabaco, arroz, trigo e cana-de-açúcar, as plantas transformadas apresentaram superexpressão de prolina e tolerância ao estresse salino e hídrico, com incremento de biomassa, evidenciando a sua função osmoprotetora e osmorreguladora (KISHOR et al., 1995; ZHU et al., 1998; SAWAHEL e HASSAN, 2002; MOLINARI et al., 2007).

O gene P5CS também foi isolado de outras plantas como *arabidopsis*, arroz, sorgo e cana-de-açúcar (SAVOURÉ et al., 1995; IGARASHI et al., 1997; SU et al., 2011; LI et al., 2018). Quando utilizados na transformação genética em petúnia, batata, tabaco e cana-de-açúcar, as plantas transformadas também apresentaram tolerância ao estresse hídrico e salino (YAMADA et al., 2005; AMINI; GHOBADI; YAMCHI, 2015; LI et al., 2018).

A compreensão da modulação da prolina é de grande relevância para o melhoramento genético de plantas, uma vez que viabiliza a transformação genética para incremento da síntese de prolina, possibilitando prolongar a sobrevivência de plantas expostas a condições de estresse (BHASKARA; YANG; VERSLUES, 2015; LI et al., 2018; RAJASHEKER et al., 2019).

2.4. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA

A transformação genética é uma ferramenta significativa em programas de melhoramento de plantas. Ela permite que genes responsáveis por características agrônomicas úteis sejam introduzidos diretamente no DNA vegetal. Possibilitando a transferência de genes desejáveis de um organismo para outro, ou seja, uma

modificação genética controlada em que há introdução, exclusão ou substituição no DNA do receptor (BRASILEIRO; ALENCAR, 1999; MOHAN, 2016; KESHAVAREDDY; KUMAR; RAMU, 2018).

A adoção da tecnologia dos organismos geneticamente modificados (OGM) ampliou de forma considerável os limites da disponibilidade de genes impostos pela incompatibilidade sexual no melhoramento convencional. Causando uma reestruturação de cadeia produtiva em todo o mundo, uma vez que, é possível transferir para as plantas genes de diferentes organismos. (BRASILEIRO; ALENCAR, 1999; BRASILEIRO; CARNEIRO, 2015).

As principais culturas transgênicas plantadas mundialmente são soja, milho, algodão e canola. A adoção global em 2019 foi de 190,4 milhões de hectares, divididos em 29 países, com Estados Unidos em primeiro lugar seguidos de Brasil, Argentina, Canadá e Índia. (ISAAA, 2019). Dentre as características agrônômicas de interesse, a resistência a pragas têm sido uma das mais aplicadas nas culturas geneticamente modificadas (KESHAVAREDDY; KUMAR; RAMU, 2018). Milho, soja e cana-de-açúcar são exemplos de culturas que são plantadas comercialmente com esta característica (TABASHNIK; BREVAULT; CARRIÈRE, 2013; GRIMI et al., 2018).

A cana-de-açúcar resistente a broca (*Diatraea saccharalis*) foi a primeira cana transgênica aprovada pela CTNBio para plantio comercial no Brasil em 2017. Atualmente são quatro variedades aprovadas, todas resistentes a broca por meio da expressão de proteínas de *Bacillus thuringiensis*. Das quatro cultivares comercializadas, duas são precoces (CTC9003BT, CTC9001BT) e duas são médias (CTC7515BT, CTC20BT). A área plantada de cana transgênica no Brasil, em 2019, foi de aproximadamente 18.000 hectares. Além do Brasil, a Indonésia também possui 2.000 hectares de cana-de-açúcar transgênica (NXI-4T) tolerante ao estresse hídrico, liberada para plantio comercial pelo Ministério da Agricultura da Indonésia em 2018 (ISAAA, 2019; LAJOLO; YOKOYAMA; CHEAVEGATTI GIANOTTO, 2021; CTC, 2021).

Desde a primeira cana-de-açúcar transgênica em 1992 uma série de metodologias para transformação genética foram adotadas em todo o mundo (BOWER; BIRCH, 1992; MOHAN, 2016). As características como resistência a viroses, bicudo da cana, tolerância aos estresses abióticos, aumento de biomassa e teor de sacarose, entre outros foram testadas (MALHOTRA et al., 2016; SCHNEIDER

et al., 2016; YAO et al., 2017; WANG et al., 2017; ASLAM et al., 2018; CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2018; ANUR et al., 2020)

A transformação genética viabiliza a expansão de plantios para regiões inadequadas para cultivos. As pesquisas com tolerância ao estresse hídrico favorecem a possibilidade de plantio em regiões com escassez de chuvas (RAMIRO et al., 2016; MALHOTRA et al., 2016). Focados nesse aspecto Molinari et al. (2007) inseriram o gene *P5CS* de *Vigna aconitifolia* em cana-de-açúcar, variedade RB855156, por biobalística. Foi concluído que a superprodução de prolina protegeu as plantas contra o estresse oxidativo causado pelo déficit hídrico. Os eventos apresentaram uma produção de biomassa pelo menos 40% maior que as plantas não transformadas ao final de 12 dias de estresse. Também trabalhando com a superprodução de prolina, Balestro et al. (2017) e Li et al. (2017) transformaram cana-de-açúcar variedades RB855536 e Guitang 21 com gene *P5CS* de *V. aconitifolia* e cana-de-açúcar, respectivamente. Balestro et al. (2017) evidenciaram que as plantas transgênicas acumularam alto teor de açúcar solúvel e Li et al. (2017) que os eventos tiveram maior teor relativo de água, clorofila, ABA e prolina, além de um menor teor de conteúdo de malondialdeído (MDA) quando comparados às plantas controle.

O estresse hídrico é um entrave para produção de cana-de-açúcar ao redor do mundo, por isso, países como Austrália, China, Índia e Brasil produziram estudos com diferentes genes com o mesmo objetivo de aumentar a tolerância a seca (BASNAYAKE et al., 2012; MALHOTRA et al., 2016; RAMIRO et al., 2016; LI et al., 2017). Os genes da família DREB (*Ea-DRB2b*, *DREB1A*, *AtDREB2A CA*), importante na ativação de genes funcionais relacionados a tolerância ao estresse, genes supressores de morte celular (*AtBI-1*) e outros como *EaHSP70*, *AVP1* foram introduzidos em cana-de-açúcar e apresentaram resultados promissores no aumento da tolerância ao estresse hídrico da cultura (AUGUSTINE et al., 2015; RAZA et al., 2016; MALHOTRA et al., 2016; RAMIRO et al., 2016; SOUZA et al., 2019; ZHAO et al., 2020).

A cana-de-açúcar possui diversos trabalhos com transformação genética, porém, a aprovação para cultivo comercial foi realizada apenas em 2017, revelando as dificuldades encontradas na transgenia para a cultura. O processo é prejudicado pela baixa eficiência de transformação, variação somaclonal, inativação do transgene, longo ciclo e instabilidade. Retardando assim a velocidade de testes, avaliações e

possíveis aprovações para cultivo comercial (HOTTA et al., 2010; DAL-BIANCO et al., 2012, BRASIL, 2017).

Outro ponto que merece destaque na transformação genética da cana-de-açúcar é a metodologia utilizada. Por ser uma monocotiledônea, teoricamente não responde bem a transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Esta metodologia é simples, eficiente e de baixo custo, porém é dependente do genótipo (HOTTA et al., 2010; FERREIRA et al., 2017). Para contornar a limitação da dependência do genótipo, cepas de *Agrobacterium* mais virulentas podem ser utilizadas ou outras metodologias, como a biobalística (LAKSHMANAN et al., 2005).

2.4.1. BIOBALÍSTICA

A biobalística, bombardeamento com micropartículas ou aceleração de partículas, foi descrita a primeira vez por Sanford et al. (1987) e possibilitou a transformação genética de diversas culturas, como, cana-de-açúcar, citrus, tabaco, trigo, soja, sorgo, entre outras (MOLINARI et al., 2007; LEVY, et al., 2018; YANG et al., 2015; XUE; DRENTH; MCINTYRE, 2015; DE LA TORRE; FINER, 2015; BELIDE et al., 2017; OZYIGIT; KURTOGLU, 2020). Já que, não apresenta limitações de genótipo (LACORTE et al., 1999).

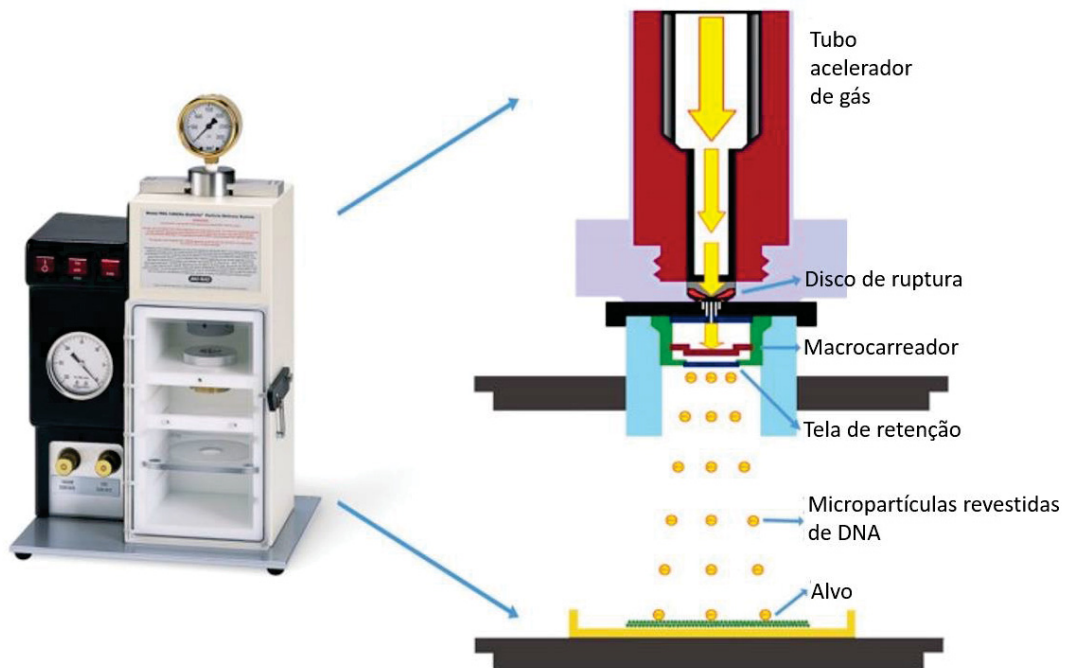
O bombardeamento é versátil e permite a introdução de genes em organelas, bactérias, protozoários, fungos, algas, facilita a transformação de cereais recalcitrantes, monocotiledôneas e dicotiledôneas (não suscetíveis a *Agrobacterium*). Além disso, diferentes tipos de tecidos e células podem ser utilizados para transformação, tais como folhas, caules e calos (LACORTE et al., 1999, KESHAVAREDDY; KUMAR; RAMU, 2018).

O método é físico, para isso são utilizados microprojéteis de alta velocidade para transportar o DNA através das paredes e membranas celulares (FIGURA 4). Assim, o DNA é introduzido em células e tecidos intactos por microprojéteis de alta velocidade que carregam o DNA (SANFORD, 1990; SANFORD et al., 1987).

Os equipamentos utilizados para o bombardeamento basicamente utilizam um acelerador de partículas, como o gás hélio (He), como propulsor para a aceleração das micropartículas (FIGURA 4). O gás He é pressurizado e mantido por um disco de ruptura, projetado para romper a uma pressão determinada. Com o rompimento do disco de ruptura uma onda de choque é gerada e carrega o macrocarreador, contendo

as micropartículas cobertas com DNA, em direção a tela de retenção. A tela retém a membrana carreadora e as micropartículas seguem em direção ao material vegetal alvo, penetrando na parede celular e membrana plasmática. O sistema é montado em uma câmara de vácuo para reduzir a desaceleração das partículas (LACORTE et al., 1999; VIANNA; ARAGÃO; RECH, 2015; OZYIGIT; KURTOGLU, 2020).

FIGURA 4 - APARELHO DE BIOBALÍSTICA MODELO: PDS-1000/HE PARTICLE DELIVERY SYSTEM - BIO-RAD LABORATORIES, INC.



Fonte: Adaptado OZYIGIT e KURTOGLU, 2020.

As micropartículas ideais são as de metal denso, para fornecer energia cinética suficiente para penetração celular, e quimicamente inertes. Diferentes materiais como, paládio, platina e ródio podem ser utilizados (OZYIGIT; KURTOGLU, 2020). Porém, as mais comuns são as de ouro e tungstênio. O ouro é biologicamente inerte, possui o formato mais uniforme. Já o tungstênio possui formato irregular e está sujeito a oxidação rápida e a degradação do DNA. A escolha do tipo de microprojétil utilizado depende do material vegetal alvo (LACORTE et al., 1999).

No sistema de bombardeamento é difícil controlar onde e como as micropartículas irão penetrar no material vegetal, este é um dos motivos da baixa eficiência e reprodutibilidade do método quando comparado a *Agrobacterium*. É

possível ocorrer a integração aleatória de múltiplas cópias do gene, resultando em composições irregulares e o silenciamento gênico, ou seja, a não expressão do gene alvo (FERREIRA et al., 2017; KRISHNAN; MOHAN, 2017; ISMAGUL et al., 2018). Para reduzir este problema, a concentração de DNA carregado nas micropartículas deve ser observada, concentrações mais baixas reduzem as chances de integração de mais de uma cópia do gene (ANUNANTHINI; KUMAR; SATHISHKUMAR, 2017).

Outros fatores como pureza do DNA, aglomeração, dispersão e velocidade das partículas, estado celular no momento do impacto e condições celulares após o bombardeamento são aspectos que influenciam na eficiência da biobalística (SANFORD, 1990). Existem diferentes procedimentos de preparação do revestimento das micropartículas com DNA, a maioria utiliza o complexo DNA/espermidina/ Ca^{2+} , porém, já existem outros métodos como o com polietilenoglicol (PEG) e cloreto de magnésio (ISMAGUL, et al. 2018). A concentração de DNA precisa ser bem ajustada, alta quantidade pode causar danos aos tecidos e aumentar a frequência da expressão transitória. A pressão e a distância entre o tiro e o material alvo devem ser cuidadosamente otimizadas, pois podem causar danos celulares na amostra ou baixo rendimento da transformação (ANUNANTHINI; KUMAR; SATHISHKUMAR, 2017; OZYIGIT; KURTOGLU, 2020).

O tecido vegetal utilizado como alvo também interfere na eficiência da transformação genética. Este é muito influenciado pelo tipo, idade, tamanho e genótipo dos explantes (CHAKRABORTY et al., 2020). O uso de tecidos totipotentes, capazes de se regenerar, no bombardeamento darão origem a plantas transformadas nas etapas seguintes do processo. Os tecidos meristemáticos e células embriogênicas são os mais comumente utilizados, pois têm apresentado estabilidade e alta capacidade de regeneração (SANFORD, 1990; KESHAVAREDDY; KUMAR; RAMU, 2018; OZYIGIT; KURTOGLU, 2020).

2.5. EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

A embriogênese somática (ES) é muito utilizada na transformação genética da cana-de-açúcar, tanto para a transformação por *Agrobacterium* quanto por biobalística (WANG et al., 2017; CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2018). A capacidade de regeneração das células embriogênicas, a possibilidade de formação de várias plantas, a elevada similaridade com o tecido parental e a alta taxa de divisão ativa que

favorece a integração do transgene, justificam o seu uso na transformação (OCHOA-ALEJO, 2016; SOWMYA; USHARANI; MOHANDAS, 2016).

A ES é um processo natural em que, células somáticas desenvolvem-se por meio dos diferentes estágios embriogênicos dando origem a uma planta sem que ocorra fecundação e sem ligação ao tecido materno. As plantas formadas são idênticas a planta-mãe, uma vez que não há fusão de gametas (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999; VON ARNOLD, 2008). A ES é um processo natural e ocorre em diferentes plantas como citrus e Kalanchoe. Em diversas espécies de Kalanchoe pequenas estruturas bipolares aparecem nas bordas das folhas que desenvolvem novas plantas. Em citrus, a poliembrionia é comum, sementes formam embriões nucelares (DUARTE et al., 2013, LOYOLA-VARGAS e OCHOA-ALEJO, 2016).

A embriogênese das monocotiledôneas é caracterizada pelos seguintes estágios: zigótico, globular, estágio de coleóptilo, estágio vegetativo juvenil e maturação. As diferenças entre a embriogênese em eudicotiledôneas e monocotiledôneas se iniciam após o estágio globular, o embrião torna-se cordiforme nas eudicotiledôneas e cilíndrico nas monocotiledôneas. Além disso, existem variações morfológicas como a formação de escutelo, coleóptilo e coleoriza (FLOH; SANTOS; DEMARCO, 2015; TAIZ et al, 2017; ZHAO et al, 2017; RADOEVA et al, 2019). Em trabalhos de ES de cana-de-açúcar foi possível observar que embriões após passarem a fase globular, formaram escutelo e coleóptilo (ALCANTARA et al, 2014; NOGUEIRA et al, 2019; SATHISH et al, 2019).

No processo de ES *in vitro*, a indução das células somáticas pode acontecer por duas vias, direta ou indireta. Quando o processo é direto, embriões somáticos são formados na borda do explante. Da forma indireta, a ES ocorre por meio da formação de calos, tecido desorganizado e dediferenciado (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999; MÉNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2019).

Diferentes tecidos podem ser utilizados na ES desde que tenham competência para perceber os estímulos de indução para a ES, quanto maior o nível de competência menor a necessidade de indutores para formação dos embriões (FEHÉR, 2015). Tecidos com baixa competência necessitarão de níveis maiores de estímulo. Os tecidos jovens e meristemáticos são mais suscetíveis a formar embriões somáticos, pois possuem menor determinação e maior competência (VON ARNOLD, 2008). Lakshmanan et al. (2006) observaram que explantes de cana-de-açúcar provenientes de ápices meristemáticos com 1 a 2 mm de comprimento formaram 45%

mais brotos que os explantes com 5 a 6 mm, além disto, colocá-los com a extremidade distal em contato com o meio de cultura foi mais eficiente.

A indução dos tecidos para início da ES é multifatorial e ainda é um ponto de questionamentos. A sinalização envolve uma complexa rede e a reprogramação da expressão gênica (KUMAR; STADEN, 2017; MÉNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2019). Esta reprogramação geralmente é desencadeada em tecidos expostos transitoriamente ao estresse, como, alta concentração de reguladores vegetais, luminosidade, baixa ou alta temperatura e choque osmótico. A indução resulta na desdiferenciação das células somáticas e então rediferenciação, alterando assim a determinação celular e possibilitando novas competências às células responsivas presentes no tecido vegetal. Assim, o tecido se torna apto ao desenvolvimento de embriões somáticos (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999; FEHÉR, 2015; HORSTMAN; BEMER; BOUTILIER, 2017).

A diversidade de sinalizadores que podem ser utilizados para indução da ES é justificada pela interação entre o agente indutor com os níveis endógenos de hormônios do tecido vegetal, que variam com o genótipo, fase de desenvolvimento, tipo de explante, entre outros (FEHÉR, 2015). Os indutores mais utilizados são as auxinas fortes, entre elas o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), que desempenham um papel chave na ES. Ao que tudo indica, a auxina é responsável por desencadear o processo de desdiferenciação, desta forma, o balanço de auxina endógena e exógena é determinante para a indução da ES (KUMAR; STADEN, 2017).

Diferentes trabalhos têm mostrado a importância da auxina. Trabalhando com arroz, cultivares MR123 e MR127, Ahmad et al. (2013) comprovaram que explantes expostos ao 2,4-D induziram em 70 e 76% a formação de CE em relação ao tratamento controle (sem reguladores) que não apresentou formação de CE. Para a cultura do milho concentrações de 1,0 a 3,0 mg L⁻¹ de 2,4-D foram as mais indicadas para indução de calos em diferentes genótipos (LUCENA et al., 2015). Já para a cana-de-açúcar, Alcântara et al. (2014) observaram que para indução de CE a concentração de 13,5 µM de 2,4-D é a ideal para as variedades RB855156 e RB72454. Também trabalhando com cana-de-açúcar, Kaur e Kapoor (2016) induziram CE nas variedades CoJ64, CoJ83 e CoJ86 em meio de cultura suplementado com 4 mg L⁻¹ de 2,4-D e 0,5 mg L⁻¹ de cinetina.

A auxina é indispensável para a formação correta da polaridade dos embriões somáticos, assim como em embriões zigóticos, eles são bipolares, com um polo apical

e outro basal, cada um com um meristema (HORSTMAN; BEMER; BOUTILIER, 2017). A padronização apical-basal do embrião é dependente das diferenças na distribuição de auxina, que são criadas pela sua movimentação nas células (TAIZ et al., 2017).

Apensar da sua importância na indução dos calos e início da ES, em algumas espécies é recomendado uma redução na concentração de auxina na fase seguinte da ES, a maturação. É nesta fase que os embriões somáticos irão amadurecer morfológica e fisiologicamente. O potencial de conversão acontece aqui e é ele que irá garantir um desempenho pós-embriônico satisfatório (MÉNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2019).

A complexidade do processo de tornar uma célula somática em embriogênica apresenta alguns problemas relevantes, como a heterogeneidade, em um tecido caloso é possível encontrar embriões em diferentes estágios de desenvolvimento, dificultando a sincronização da produção de embriões (LOYOLA-VARGAS, 2016). Outro ponto é a possibilidade de variação somaclonal, uma vez que as células passam por um processo estressante de rápida e intensa divisão celular (HERVÉ et al., 2016).

A técnica da embriogênese somática é uma das formas de viabilizar a transformação genética, sementes sintéticas e a produção massal de mudas em diversas culturas. Entender o processo, reduzir as dificuldades e otimizá-lo é oferecer mais uma ferramenta para o melhoramento genético de plantas e para a produção de mudas em larga escala (KUMAR; STADEN, 2017; MÉNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2019).

REFERÊNCIAS

AGUIAR, N. O.; MEDICI, L. O.; OLIVARES, F. L.; et al. Metabolic profile and antioxidant responses during drought stress recovery in sugarcane treated with humic acids and endophytic diazotrophic bacteria. **Annals of Applied Biology**, v. 168, n. 2, p. 203–213, 2016.

AHMAD, F. I.; JOHAN, N. S.; WAGIRAN, A. Effect of 2,4-D on Embryogenic Callus Induction of Malaysian indica Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars MR123 and MR127. **Jurnal Teknologi**, v. 64, n. 2, p. 75–78, 2013.

ALCANTARA, G. B. DE; DIBAX, R.; BESPALHOK FILHO, J. C.; DAROS, E. Plant regeneration and histological study of the somatic embryogenesis of sugarcane

(*Saccharum* spp.) cultivars RB855156 and RB72454. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 36, n. 1, p. 63, 2014.

AMINI, S.; GHOBADI, C.; YAMCHI, A. Proline accumulation and osmotic stress: an overview of P5CS gene in plants. **Journal of Plant Molecular Breeding**, v. 3, n. 2, p. 44–55, 2015.

ANUNANTHINI, P.; KUMAR, S. R.; SATHISHKUMAR R. Factors Affecting Genetic Transformation Efficiency in Sugarcane. In: MOHAN, C. **Sugarcane Biotechnology: Challenges and Prospects**. São Carlos. Springer. 2017. p. 51-60.

ANUR, R. M.; MUFITHAH, N.; SAWITRI, W. D.; SAKAKIBARA, H.; SUGIHARTO, B. Overexpression of sucrose phosphate synthase enhanced sucrose content and biomass production in transgenic sugarcane. **Plants**, v. 9, n. 200, p. 1–11, 2020.

ARAÚJO, R.; ALVES JUNIOR, J.; CASAROLI, D.; EVANGELISTA, A. W. P. Variação na qualidade da matéria-prima da cana-de-açúcar em decorrência da suspensão da irrigação antes da colheita e da ocorrência de baixas temperaturas. **Bragantia**, v. 75, n. 1, p. 118–127, 2016.

ASLAM, U.; TABASSUM, B.; NASIR, I. A.; KHAN, A.; HUSNAIN, T. A virus-derived short hairpin RNA confers resistance against sugarcane mosaic virus in transgenic sugarcane. **Transgenic Research**, v. 27, n. 2, p. 203–210, 2018.

AUDE, M. I. DA S. Estádios de Desenvolvimento da Cana-de-açúcar e suas Relações com a Produtividade. **Ciência Rural**, v. 23, n. 2, p. 241–248, 1993.

AUGUSTINE, S. M.; ASHWIN NARAYAN, J.; SYAMALADEVI, D. P.; et al. Overexpression of EaDREB2 and pyramiding of EaDREB2 with the pea DNA helicase gene (PDH45) enhance drought and salinity tolerance in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid). **Plant Cell Reports**, v. 34, n. 2, p. 247–263, 2014.

AUGUSTINE, S. M.; NARAYAN, J. A.; SYAMALADEVI, D. P.; et al. Erianthus arundinaceus HSP70 (EaHSP70) overexpression increases drought and salinity tolerance in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid). **Plant Science**, v. 232, p. 23–34, 2015.

BALESTRO, G. C.; HIGASHI, B.; LOPES, S. M. S.; et al. Biochemical composition of symplastic sap from sugarcane genetically modified to overproduce proline. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 113, p. 133–140, 2017.

BASNAYAKE, J.; JACKSON, P. A.; INMAN-BAMBER, N. G.; LAKSHMANAN, P. Sugarcane for water-limited environments. Genetic variation in cane yield and sugar content in response to water stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 16, p. 6023–6033, 2012.

BASNAYAKE, S. W. V.; MOYLE, R.; BIRCH, R. G. Embryogenic callus proliferation and regeneration conditions for genetic transformation of diverse sugarcane cultivars. **Plant Cell Reports**, v. 30, n. 3, p. 439–448, 2011.

- BASU, S.; RAMEGOWDA, V.; KUMAR, A.; PEREIRA, A. Plant adaptation to drought stress. **F1000Research**, v. 5, p. 1–10, 2016.
- BATISTA, E. L. DAS S.; ZOLNIER, S.; RIBEIRO, A.; et al. Avaliação do efeito do estresse hídrico no crescimento de cultivares de cana-de-açúcar usando um sistema automático de fertirrigação. **Engenharia Agrícola**, v. 35, n. 2, p. 215–229, 2015.
- BATTIE LACLAU, P.; LACLAU, J. P. Growth of the whole root system for a plant crop of sugarcane under rainfed and irrigated environments in Brazil. **Field Crops Research**, v. 114, n. 3, p. 351–360, 2009.
- BELIDE, S.; VANHERCKE, T.; PETRIE, J. R.; SINGH, S. P. Robust genetic transformation of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) using differentiating embryogenic callus induced from immature embryos. **Plant Methods**, v. 13, n. 109, p. 1–12, 2017.
- BHASKARA, G. B.; YANG, T. H.; VERSLUES, P. E. Dynamic proline metabolism: Importance and regulation in water limited environments. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1–7, 2015.
- BLUM, A. Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production. **Plant Cell and Environment**, v. 40, n. 1, p. 4–10, 2017.
- BOWER, R.; BIRCH, R. G. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. **The Plant Journal**, v. 2, n. 3, p. 409–416, 1992.
- BOWER, R.; ELLIOTT, A. R.; POTIER, B. A. M.; BIRCH, R. G. High-efficiency, microprojectile-mediated cotransformation of sugarcane, using visible or selectable markers. **Molecular Breeding**, v. 2, n. 3, p. 239–249, 1996.
- BRAIBANTE, M. E. F.; PAZINATO, M. S.; ROCHA, T. R. DA; FRIEDRICH, L. DA S.; NARDY, F. C. A Cana-de-Açúcar no Brasil sob um Olhar Químico e Histórico: Uma Abordagem Interdisciplinar. **Química Nova na Escola**, v. 35, n. 1, p. 3–10, 2013.
- BRASIL, Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio. Extrato de parecer técnico nº 5.483/2017. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. 2017
- BRASILEIRO, A. C. M.; ALENCAR, D. M. Transformação Genética de Plantas. In: TORRES, A. C., CALDAS, Linda Styer, BUSO, José Amauri. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. 1. Ed. Brasília: Embrapa. 1999. p. 679-736.
- BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. de C. **Manual De Transformação Genética De Plantas**. 2. Ed. Brasília: Embrapa. 2015. p.16-19
- CAI, S.; JIANG, G.; YE, N.; et al. A key ABA catabolic gene, OsABA8ox3, is involved in drought stress resistance in rice. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. 1–13, 2015.
- CARVALHO, A. L. DE; SANTOS, D. V.; MARENGO, J. A.; COUTINHO, S. M. V.; MAIA, S. M. F. Impactos da ocorrência de eventos climáticos extremos na produção agrícola brasileira. **Sustentabilidade em Debate**, v. 11, n. 3, p. 197–210, 2020.

CARVALHO, S. A. D.; FURTADO, A. T. O Melhoramento Genético de Cana-de-açúcar no Brasil e o Desafio das Mudanças Climáticas Globais. **Revista Gestão & Conexões**, v. 2, n. 1, p. 22–46, 2013.

CHAKRABORTY, N., CHAKRABORTY, P., SEN, M., BANDOPADHYAY, R. Choice of Explant for Plant Genetic Transformation. *In*: RUSTGI, H., LUO, H. **Biolistic DNA Delivery in Plants**. Springer Protocols. p. 107-123. 2020.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; GENTILE, A.; OLDEMBURGO, D. A.; et al. Lack of detection of Bt sugarcane Cry1Ab and nptII DNA and proteins in sugarcane processing products including raw sugar. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 6, p. 1–24, 2018.

CIA, M. C.; GUIMARÃES, A. C. R.; MEDICI, L. O.; CHABREGAS, S. M.; AZEVEDO, R. A. Antioxidant responses to water deficit by drought-tolerant and -sensitive sugarcane varieties. **Annals of Applied Biology**, v. 161, n. 3, p. 313–324, 2012.

CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-açúcar 2018/2019. **Companhia Nacional de Abastecimento**, v. 5, n. 3, p. 70, 2018.

CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-açúcar 2020/21. **Companhia Nacional de Abastecimento**, v. 7, n. 2, p. 64, 2020a.

CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-açúcar 2019/2020. **Companhia Nacional de Abastecimento**, v. 6, n. 4, p. 62, 2020b.

COMEXSTAT. Exportação e Importação Geral. Disponível em: <<http://comexstat.mdic.gov.br/pt/geral/19040>>. Acesso em 11.set.2020

CTC. Variedades CTC. Disponível em: <<https://ctc.com.br/produtos/>>. Acesso em: 15 nov. 2021.

D'HONT, A.; GRIVET, L.; FELDMANN, P.; et al. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. **Molecular And General Genetics**, v. 250, p. 405–413, 1996.

DAL-BIANCO, M.; CARNEIRO, M. S.; HOTTA, C. T.; et al. Sugarcane improvement: How far can we go? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 265–270, 2012.

DAR, MUDASIR IRFAN, NAIKOO, MOHD IRFAN, REHMAN, FARHA, NAUSHIN, FAUZIA, KHAN, F. A. Proline Accumulation in Plants: Roles in Stress Tolerance and Plants Development. **Osmolytes and Plants Acclimation to Changing Environment: Emerging Omics Technologies**. p.155–163, 2015.

DAS, K.; ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in Environmental Science**, v. 2, p. 1–13, 2014.

- DE FREITAS, P.A.F.; DE SOUZA, M. R.; MARQUES, E.C. et al. Salt Tolerance Induced by Exogenous Proline in Maize Is Related to Low Oxidative Damage and Favorable Ionic Homeostasis. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 37, p. 911–924, 2018.
- DINH, T. H.; WATANABE, K.; TAKARAGAWA, H.; NAKABARU, M.; KAWAMITSU, Y. Photosynthetic response and nitrogen use efficiency of sugarcane under drought stress conditions with different nitrogen application levels. **Plant Production Science**, v. 20, n. 4, p. 412–422, 2017.
- DOORENBOS, J.; KASSAN, A. H. Yield response to water. Rome: FAO, p. 193. FAO, **Irrigation and Drainage Paper**, 33. 1979.
- DUARTE, F. E. V. DE O.; BARROS, D. DOS R.; GIRARDI, E. A.; SOARES FILHO, W. DOS S.; PASSOS, O. S. Poliembriõnia e atributos morfolõgicos de sementes de porta-enxertos de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 1, p. 246–254, 2012.
- FAOSTAT. **Production - Crops and livestock products**. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/domains_table>. Acesso em 14 nov. 21.
- FEHÉR, A. Somatic embryogenesis - stress-induced remodeling of plant cell fate. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1849, n. 4, p. 385–402, 2015.
- FERREIRA, T. H. S.; TSUNADA, M. S.; BASSI, D.; et al. Sugarcane water stress tolerance mechanisms and its implications on developing biotechnology solutions. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1–18, 2017.
- FLOH, E. I. S.; SANTOS, A. L. W.; DEMARCO, D. Embriogênese vegetal: abordagens básicas e biotecnológicas. **Biotecnologia Aplicada à Saúde**. p.87–111, 2015.
- GRIMI, D. A.; PARODY, B.; RAMOS, M. L.; et al. Field-evolved resistance to Bt maize in sugarcane borer (*Diatraea saccharalis*) in Argentina. **Pest Management Science**, v. 74, n. 4, p. 905–913, 2018.
- GUERRA, M. P., TORRES, A. C., TEIXEIRA, J. B. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. 1. Ed. Brasília: Embrapa. 1999. p 533-568
- HANIF, S., SALEEM, M.F., SARWAR, M. et al. Biochemically Triggered Heat and Drought Stress Tolerance in Rice by Proline Application. **J Plant Growth Regul** 40, 305–312, 2021.
- HAYAT, S.; HAYAT, Q.; ALYEMENI, M. N.; et al. Role of proline under changing environments: A review. **Plant Signaling and Behavior**, v. 7, n. 11, p. 1456–1466, 2012.

HERVÉ, E., ROMAIN, G., THIERRY, B., JEAN-CHRISTOPHE, B., ESTELLE, J. Plant Fidelity in Somatic Embryogenesis-Regenerated Plants. In: LOYOLA-VARGAS, V.M, OCHOA-ALEJO, N. **Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications**. Springer. p. 121-150. 2016.

HIMMELBACH, A.; YANG, Y.; GRILL, E. Relay and control of abscisic acid signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, n. 5, p. 470–479, 2003.

HONG, Z.; LAKKINENI, K.; ZHANG, Z.; VERMA, D. P. S. Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. **Plant Physiology**, v. 122, n. 4, p. 1129–1136, 2000.

HOQUE, M. A.; BANU, M. N. A.; OKUMA, E.; et al. Exogenous proline and glycinebetaine increase NaCl-induced ascorbate-glutathione cycle enzyme activities, and proline improves salt tolerance more than glycinebetaine in tobacco Bright Yellow-2 suspension-cultured cells. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, n. 11, p. 1457–1468, 2007.

HOSSAIN, M. A.; BHATTACHARJEE, S.; ARMIN, S. M.; et al. Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: Insights from ROS detoxification and scavenging. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1–19, 2015.

HOTTA, C. T.; LEMBKE, C. G.; DOMINGUES, D. S.; et al. The biotechnology roadmap for sugarcane improvement. **Tropical Plant Biology**, v. 3, n. 2, p. 75–87, 2010.

HSIAO, T.C. Plant response to water stress. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.4, p.519-70, 1973.

IGARASHI, Y.; YOSHIBA, Y.; SANADA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; WADA, K. SHINOZAKI, K. Characterization of the gene for Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase and correlation between the expression of the gene and salt tolerance in *Oryza sativa* L. **Plant Molecular Biology** 33: 857–865, 1997.

INMAN-BAMBER, N. G.; LAKSHMANAN, P.; PARK, S. Sugarcane for water-limited environments: Theoretical assessment of suitable traits. **Field Crops Research**, v. 134, p. 95–104, 2012.

INMAN-BAMBER, N. G.; SMITH, D. M. Water relations in sugarcane and response to water deficits. **Field Crops Research**, v. 92, p. 185–202, 2005.

IPCC. Global warming of 1.5 °C. **Ipcc - Sr15**, v. 2, n. October, p. 17–20, 2018. Disponível em: <www.environmentalgraphiti.org>.

ISAAA. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2019: Biotech Crops Drive SocioEconomic Development and Sustainable Environment in the New Frontier. **ISAAA Brief** No. 55. ISAAA: Ithaca, NY. 2019.

ISMAGUL, A.; YANG, N.; MALTSEVA, E.; et al. A biolistic method for high-throughput production of transgenic wheat plants with single gene insertions. **BMC Plant Biology**, v. 18, n. 1, p. 1–8, 2018.

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 Reports**, v. 29, n. 2, p. 173–183, 2010.

JÚNIOR, S. DE O. M.; DE ANDRADE, J. R.; DOS SANTOS, C. M.; et al. Osmoregulators' accumulation minimizes the effects of drought stress in sugarcane and contributes to the recovery of photochemical efficiency in photosystem II after rewatering. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 42, n. 4, p. 1–11, 2020.

KAUR, G.; ASTHIR, B. Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. **Biologia Plantarum**, v. 59, p. 609–619, 2015.

KAUR, G.; ASTHIR, B. Impact of exogenously applied ABA on proline metabolism conferring drought and salinity stress tolerance in wheat genotypes. **Cereal Research Communications**, v. 48, n. 3, p. 309–315, 2020.

KAUR, R.; KAPOOR, M. Plant Regeneration Through Somatic Embryogenesis in Sugarcane. **Sugar Tech**, v. 18, n. 1, p. 93–99, 2016.

KEATING, B. A.; ROBERTSON, M. J.; MUCHOW, R. C.; HUTH, N. I. Modelling sugarcane production systems I. Development and performance of the sugarcane module. **Field Crops Research**, v. 61, n. 3, p. 253–271, 1999.

KESHAVAREDDY, G.; KUMAR, A. R. V.; S. RAMU, V. Methods of Plant Transformation- A Review. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 7, n. 07, p. 2656–2668, 2018.

KHONGHINTAISONG, J.; SONGSRI, P.; TOOMSAN, B.; JONGRUNGKLANG, N. Rooting and Physiological Trait Responses to Early Drought Stress of Sugarcane Cultivars. **Sugar Tech**, v. 20, n. 4, p. 396–406, 2018.

KISHOR, POLAVARAPU BILHAN KAVI, HONG, ZONGLIE, MIAO, GUO-HUA, HU, CHEIN-AN A., VERMA, D. P. S. Overexpression of A1-Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase Increases Proline Production and Confers Osmotolerance in Transgenic Plants'. **Plant Physiology**, v. 108, p. 1387–1394, 1995.

KRISHNAN, S. Radhesh, MOHAN, Chakravarthi. Methods of Sugarcane Transformation. In: MOHAN, Chakravarthi. **Sugarcane Biotechnology: Challenges and Prospects**. São Carlos. Springer. 2017. p. 51-60

KUMAR, V.; VAN STADEN, J. New insights into plant somatic embryogenesis: an epigenetic view. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, n. 9, p. 1–17, 2017.

KUMAR, T.; UZMA.; KHAN, M. R.; ABBAS, Z.; ALI, G. M. Genetic improvement of sugarcane for drought and salinity stress tolerance using *Arabidopsis* vacuolar pyrophosphatase (AVP1) gene. **Biotechnol.** v.56, n. 3, p. 199-209, 2014.

LACORTE, C.; ARAGÃO, F. J. L.; VAINSTEIN, M. H.; RECH, E. L. Transformação Genética de Plantas. *In*: TORRES, A. C., CALDAS, Linda Styer, BUSO, José Amauri. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. 1. Ed. Brasília: Embrapa. 1999. p.761-781.

DE LA TORRE, C. M.; FINER, J. J. The intron and 5' distal region of the soybean Gmubi promoter contribute to very high levels of gene expression in transiently and stably transformed tissues. **Plant Cell Reports**, v. 34, n. 1, p. 111–120, 2015.

LAJOLO, F. M.; YOKOYAMA, S. M.; CHEAVEGATTI GIANOTTO, A. Sugar derived from genetically modified sugarcane. **Food Science and Technology (Brazil)**, v. 41, n. 1, p. 1–7, 2021.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R. J.; AITKEN, K. S.; et al. Sugarcane Biotechnology: The Challenges and Opportunities. **In Vitro Cell. Dev. Biol**, v. 41, n. August, p. 345–363, 2005.

LAKSHMANAN, P.; ROBINSON, N. Stress Physiology: Abiotic Stresses. *In*: P. H. Moore; F. C. Botha (Orgs.); **Sugarcane: Physiology ,Biochemistry and Functional Biology**. 1° ed, p.411–434, 2014.

LAMAOU, M.; JEMO, M.; DATLA, R.; BEKKAOU, F. Heat and drought stresses in crops and approaches for their mitigation. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, n. February, p. 1–14, 2018.

LEHMANN, S.; FUNCK, D.; SZABADOS, L.; RENTSCH, D. Proline metabolism and transport in plant development. **Amino Acids**, v. 39, n. 4, p. 949–962, 2010.

LEVY, A.; EL-MOCHTAR, C.; WANG, C.; GOODIN, M.; ORBOVIC, V. A new toolset for protein expression and subcellular localization studies in citrus and its application to citrus tristeza virus proteins. **Plant Methods**, v. 14, n. 1, p. 1–11, 2018.

LI, C.; NONG, Q.; SOLANKI, M. K.; et al. Differential expression profiles and pathways of genes in sugarcane leaf at elongation stage in response to drought stress. **Scientific Reports**, v. 6, n. December 2015, p. 1–11, 2016.

LI, J.; PHAN, T. T.; LI, Y. R.; XING, Y. X.; YANG, L. T. Isolation, Transformation and Overexpression of Sugarcane SoP5CS Gene for Drought Tolerance Improvement. **Sugar Tech**, v. 20, n. 4, p. 464–473, 2018.

LIANG, X.; ZHANG, L.; NATARAJAN, S. K.; BECKER, D. F. Proline mechanisms of stress survival. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 19, n. 9, p. 998–1011, 2013.

LOYOLA-VARGAS, V. M. The History of Somatic Embryogenesis. *In*: LOYOLA-VARGAS, V.M, OCHOA-ALEJO, N. **Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications**. Springer. p. 11-22. 2016.

LUCENA, A. L. M.; ELOI, I. B. DE O.; MANGOLIN, C. A.; MACHADO, M. DE F. P. DA S. Embriogênese Somática em Milho: Trajetória e Eficiência. **Plant Cell Cult. Micropropag.**, v. 11, n. 2, p. 33–53, 2015.

MACHADO, R. S.; RIBEIRO, R. V.; EDUARDO, P.; MARCHIORI, R. Respostas biométricas e fisiológicas ao déficit hídrico em cana-de-açúcar em diferentes fases fenológicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 12, p. 1575–1582, 2009.
MALHOTRA, P. K.; MITTAL, A.; CHOPRA, R.; KAUR, M.; THIND, K. S. Genetic Augmentation of Sugarcane with Stress-Inducible DREB1A Transcription Factor Using Biolistic Approach. **Sugar Tech**, v. 19, n. 5, p. 469–475, 2016.

MARAFON, A. C. Análise quantitativa de crescimento em Cana-de-açúcar: Uma introdução ao procedimento prático. **Embrapa Tabuleiros Costeiros**, v. 168, n. 1, p. 31, 2012.

MARIN, F.; NASSIF, D. S. P. Mudanças Climáticas e a Cana-de-açúcar no Brasil: Fisiologia, Conjuntura e Cenário Futuro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v. 17, n. 2, p. 232-239, 2013.

MEGA, R.; ABE, F.; KIM, J. S.; et al. Tuning water-use efficiency and drought tolerance in wheat using abscisic acid receptors. **Nature Plants**, v. 5, n. 2, p. 153–159, 2019.

MÉNDEZ-HERNÁNDEZ, H. A.; LEDEZMA-RODRÍGUEZ, M.; AVILEZ-MONTALVO, R. N.; et al. Signaling overview of plant somatic embryogenesis. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. February, p. 1–15, 2019.

MILLER, G.; SUZUKI, N.; CIFTCI-YILMAZ, S.; MITTLER, R. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. **Plant, Cell and Environment**, v. 33, n. 4, p. 453–467, 2010.

MILNER, J. L.; MCCLELLAN, D. J.; WOOD, J. M. Factors reducing and promoting the effectiveness of proline as an osmoprotectant in *Escherichia coli* K12. **Journal of General Microbiology**, v. 133, n. 7, p. 1851–1860, 1987.

MITTLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 1, p. 15–19, 2006.

MOLINARI, H. B. C.; MARUR, C. J.; DAROS, E.; et al. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): Osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, v. 130, n. 2, p. 218–229, 2007.

MORAIS, L. K.; CURSI, D. E.; dos SANTOS, J. M.; et al. **Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar**. 1^o ed. Aracaju: Embrapa, 2015.

NOAA NATIONAL CENTERS FOR ENVIRONMENTAL INFORMATION. **U.S. Billion-Dollar Weather & Climate Disasters 1980-2021**. NCDC. Disponível em: <<https://www.ncdc.noaa.gov/billions/events.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2021.

NOGUEIRA, G. F.; LUIS, Z. G.; PASQUAL, M.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. High-efficiency somatic embryogenesis of a broad range of Brazilian *Saccharum* spp. hybrids (sugarcane) varieties using explants from previously established in vitro plants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 55, n. 1, p. 26–35, 2019.

OCHOA-ALEJO, N. The Uses of Somatic Embryogenesis for Genetic Transformation. In: LOYOLA-VARGAS, V.M, OCHOA-ALEJO, N. **Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications**. Springer. 2016. p. 415-434. doi 10.1007/978-3-319-33705-0_23
OECD/FAO. **OECD-FAO Agricultural Outlook 2018-2027**. Rome: OECD Publishing, 2018.

OZYIGIT, I. I.; YUCEBILGILI KURTOGLU, K. Particle bombardment technology and its applications in plants. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 12, p. 9831–9847, 2020.

PIRES, R. C. M.; ARRUDA, F. B.; SAKAI, E. Irrigação e Drenagem. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M, G, A. **Cana-de-açúcar**. 1. Ed. Campinas: Instituto Agronômico, 2008. p. 631-670.

QIN, F.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Achievements and challenges in understanding plant abiotic stress responses and tolerance. **Plant and Cell Physiology**, v. 52, n. 9, p. 1569–1582, 2011.

RADOEVA, T.; VADDEPALLI, P.; ZHANG, Z.; WEIJERS, D. Evolution, Initiation, and Diversity in Early Plant Embryogenesis. **Developmental Cell**, v. 50, n. 5, p. 533–543, 2019.

RAJASHEKER, G.; JAWAHAR, G.; JALAJA, N.; et al. Role and regulation of osmolytes and ABA interaction in salt and drought stress tolerance. **Plant Signaling Molecules: Role and Regulation under Stressful Environments**. p.417–436, 2019.

RAMIRO, D. A.; MELOTTO-PASSARIN, D. M.; BARBOSA, M. DE A.; et al. Expression of Arabidopsis Bax Inhibitor-1 in transgenic sugarcane confers drought tolerance. **Plant Biotechnology Journal**, v. 14, n. 9, p. 1826–1837, 2016.

RAMPINO, P.; PATALEO, S.; GERARDI, C.; MITA, G.; PERROTTA, C. Drought stress response in wheat: Physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. **Plant, Cell and Environment**, v. 29, n. 12, p. 2143–2152, 2006.

REIS, R. R.; ANDRADE DIAS BRITO DA CUNHA, B.; MARTINS, P. K.; et al. Induced over-expression of AtDREB2A CA improves drought tolerance in sugarcane. **Plant Science**, v. 221–222, p. 59–68, 2014.

REJEB, K, B.; ABDELLEY, C.; SAVOURÉ, A. How reactive oxygen species and proline face stress together. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 80, p. 278–

284, 2014. Elsevier Masson SAS. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.04.007>> . .

RIPPEY, B. R. The U.S. drought of 2012. **Weather and Climate Extremes**, v. 10, p. 57–64, 2015.

SANFORD, J. C. Biolistic plant transformation. **Physiologia Plantarum**, v. 79, n. 1, p. 206–209, 1990.

SANFORD, J. C.; KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; ALLEN, N. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. **Particulate Science and Technology**, v. 5, n. 1, p. 27–37, 1987.

SATHISH, D.; THEBORAL, J.; VASUDEVAN, V.; et al. Exogenous polyamines enhance somatic embryogenesis and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation efficiency in sugarcane (*Saccharum spp. hybrid*). **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 56, n. 1, p. 29–40, 2019.

SCHNEIDER, V. K.; SOARES-COSTA, A.; CHAKRAVARTHI, M.; et al. Transgenic sugarcane overexpressing CaneCPI-1 negatively affects the growth and development of the sugarcane weevil *Sphenophorus levis*. **Plant Cell Reports**, v. 36, n. 1, p. 193–201, 2016.

SHANKER, A. K.; MAHESWARI, M.; YADAV, S. K.; et al. Drought stress responses in crops. **Functional and Integrative Genomics**, v. 14, n. 1, p. 11–22, 2014.

SHRESTHA, A.; CUDJOE, D. K.; KAMRUZZAMAN, M.; et al. Abscisic acid-responsive element binding transcription factors contribute to proline synthesis and stress adaptation in *Arabidopsis*. **Journal of Plant Physiology**, v. 261, n. April, p. 153414, 2021.

SIDDIQUE, A.; KANDPAL, G.; KUMAR, P. Proline accumulation and its defensive role under diverse stress condition in plants: An overview. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 1655–1659, 2018.

SIGNORELLI, S.; COITIÑO, E. L.; BORSANI, O.; MONZA, J. Molecular mechanisms for the reaction between $\bullet\text{OH}$ radicals and proline: Insights on the role as reactive oxygen species scavenger in plant stress. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 118, n. 1, p. 37–47, 2014.

SOUZA, W. R. DE; DE OLIVEIRA, N. G.; VINECKY, F.; et al. Field evaluation of AtDREB2A CA overexpressing sugarcane for drought tolerance. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 205, n. 6, p. 545–553, 2019.

SOWMYA, H. D.; USHARANI, T. R.; MOHANDAS, S. Somatic Embryogenesis as a Tool in Genetic Transformation. **Banana: Genomics and Transgenic Approaches for Genetic Improvement**. p.1–346, 2016.

STEWART, C. R. The Mechanism of Abscisic Acid-induced Proline Accumulation in Barley Leaves. **Plant Physiology**, v. 66, p. 230–233, 1980.

Su, M. X.F.; Li, X.Y.; Ma, X.J.; Peng, A.G.; Zhao, L.Q.; Cheng, S.Y.; Chen G.S. Liu. Cloning two P5CS genes from bioenergy sorghum and their expression profiles under abiotic stresses and MeJA treatment. **Plant Science** 181: 652–659, 2011.

SZABADOS, L.; ÁBRAHÁM, E.; ÖKÉSZ, L.; et al. Structure, function and regulation of atp5cs genes in arabidopsis. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 12, n. 2, p. 3–10, 1998.

SZABADOS, L.; SAVOURÉ, A. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 2, p. 89–97, 2010.

TABASHNIK, B. E.; BRÉVAULT, T.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to Bt crops: Lessons from the first billion acres. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 6, p. 510–521, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal, 6ª Edição**. 6º ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

VERSLUES, P. E.; SHARMA, S. Proline Metabolism and Its Implications for Plant-Environment Interaction. **The Arabidopsis Book**, v. 8, p. e0140, 2010.

VIANNA, G. R.; ARGÃO, F. J. L.; RECH, E. L. O sistema Biobalístico. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. de C. **Manual De Transformação Genética De Plantas**. 2. Ed. Brasília: Embrapa. 2015. p.90-104.

VON ARNOLD, S. Somatic Embryogenesis. In: GEORGE, E. F., HALL, M. A., KLERK, G. D. **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3. Ed. Springer. 2008. p. 335-354.

WANG, W. Z.; YANG, B. P.; FENG, X. Y.; et al. Development and characterization of transgenic sugarcane with insect resistance and herbicide tolerance. **Frontiers in Plant Science**, v. 8 , p. 1–10, 2017.

XUE, G. P.; DRENTH, J.; MCINTYRE, C. L. TaHsfA6f is a transcriptional activator that regulates a suite of heat stress protection genes in wheat (*Triticum aestivum* L.) including previously unknown Hsf targets. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 3, p. 1025–1039, 2015.

YANG, G.; LI, J.; LIU, W.; et al. Molecular cloning and characterization of MxNAS2, a gene encoding nicotianamine synthase in *Malus xiaojinensis*, with functions in tolerance to iron stress and misshapen flower in transgenic tobacco. **Scientia Horticulturae**, v. 183, p. 77–86, 2015.

YAO, W.; RUAN, M.; QIN, L.; et al. Field performance of transgenic sugarcane lines resistant to sugarcane mosaic virus. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1–9, 2017.

YOU, J.; CHAN, Z. Ros regulation during abiotic stress responses in crop plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1–15, 2015.

ZHANG, M.; ZHUO, X.; WANG, J.; et al. Effective selection and regeneration of transgenic sugarcane plants using positive selection system. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 51, n. 1, p. 52–61, 2015.

ZHAO, P.; BEGCY, K.; DRESSELHAUS, T.; SUN, M. X. Does early embryogenesis in eudicots and monocots involve the same mechanism and molecular players? **Plant Physiology**, v. 173, n. 1, p. 130–142, 2017.

ZHAO, X.; JIANG, Y.; LIU, Q.; et al. Effects of Drought-Tolerant Ea-DREB2B Transgenic Sugarcane on Bacterial Communities in Soil. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1–11, 2020.

Zouari M., Hassena A.B., Trabelsi L., Rouina B.B., Decou R., Labrousse P. Exogenous Proline-Mediated Abiotic Stress Tolerance in Plants: Possible Mechanisms. In: Hossain M., Kumar V., Burritt D., Fujita M., Mäkelä P. (eds) **Osmoprotectant-Mediated Abiotic Stress Tolerance in Plants**. Springer, Cham. 2019.

3 CAPÍTULO I: REGENERAÇÃO DAS VARIEDADES RB036066, RB036088 E RB036091 DE CANA-DE-AÇÚCAR POR MEIO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

RESUMO

O Brasil é líder mundial na produção de cana-de-açúcar e seus derivados. Para que o país continue ocupando esta posição de destaque os programas de melhoramento genético buscam obter variedades mais produtivas e adaptadas. A cultura de tecidos oferece diferentes técnicas para o melhoramento genético, como a embriogênese somática, que é uma das formas de viabilizar a transformação genética na cultura e a produção de sementes sintéticas. Assim o objetivo deste trabalho foi desenvolver protocolos de embriogênese somática para as variedades RB036088, RB036066 e RB036091. Foram realizados 5 tratamentos com concentrações de 2,4-D (0, 1, 3, 9, 18 μM) para indução de calos e 3 tipos de explantes (porção apical, mediana e basal do segmento meristemático de folhas imaturas). A multiplicação dos calos foi realizada no mesmo meio de cultura da indução e a conversão em meio de cultura MS sem adição de reguladores. A multiplicação das brotações foi realizada utilizando meio MS com adição de 0,88 μM de BAP e 0,46 μM de KIN e no enraizamento testou-se os meios MS, MS com metade dos sais, MS com adição de 70 g L⁻¹ de sacarose e MS acrescido de 2,46 μM AIB, também foi avaliada a taxa de sobrevivência na aclimatização. As concentrações mais recomendadas para indução e posterior conversão de calos foi de 3 μM de 2,4-D para as variedades RB036091, RB036066 e 9 μM de 2,4-D RB036088. Para o enraizamento e sobrevivência na aclimatização o meio MS com 70g L⁻¹ de sacarose para as variedades RB036088 e RB036091 e o MS meia força para a variedade RB036066 foram os mais adequados.

Palavras-chave: 2,4-D, *Saccharum* spp., calogênese, cultura de tecidos.

*A formatação utilizada neste capítulo obedece às normas da revista SugarTech, disponíveis no anexo 1.

ABSTRACT

Brazil is a world leader in the production of sugarcane and its derivatives. In order to the country to continue occupying this prominent position, genetic improvement programs seek to obtain more productive and adapted varieties. Tissue culture offers different techniques for genetic improvement, such as somatic embryogenesis, which is one of the ways to make possible the genetic transformation in the culture and the production of synthetic seeds. Therefore, the objective of this work was to develop somatic embryogenesis protocols for cultivars RB036088, RB036066 and RB036091. Five treatments with different concentrations of 2.4-D (0, 1, 3, 9, 18 μM) for callus induction and 3 types of explants (apical, median and basal portion of the meristematic segment of immature leaves) were performed. The multiplication of callus was performed in the same culture medium of induction and the conversion on MS culture medium without addition of regulators. The multiplication of shoots was performed using MS medium with addition of 0.88 μM of BAP and 0.46 μM of KIN and it was tested for the rooting, MS medium, MS with half of the salts, MS with addition of 70 g L⁻¹ of sucrose and MS plus 2.46 μM of AIB, the survival rate in acclimatization was also evaluated. The most recommended concentrations for induction and subsequent callus conversion were 3 μM of 2.4-D for cultivars RB036091, RB036066 and 9 μM of 2.4-D for RB036088. For rooting and survival in acclimatization, the MS medium with 70 g L⁻¹ sucrose for cultivars RB036088 and RB036091 and MS with half of the salts for cultivar RB036066 were the most suitable.

Key words: 2.4-D, *Saccharum* spp, calogenesis, tissue culture

3.1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma cultura de relevância mundial, visto que 70% do açúcar produzido no mundo é proveniente da cultura (UNICA 2016). Além do açúcar, a cultura é matéria-prima para outros derivados como etanol e bioenergia. Neste cenário, o Brasil é protagonista liderando o ranking de produção de cana-de-açúcar e exportação de açúcar. A cultura é responsável por 2% do PIB brasileiro e gera milhões de empregos diretos e indiretos (UNICA 2016).

O sucesso brasileiro na produção de cana-de-açúcar é resultado do somatório de vários fatores como o clima favorável e o uso de variedades de alta eficiência. Os programas de melhoramento genético, desenvolvidos no Brasil, levam de 10 a 15 anos de pesquisas para liberar no mercado uma nova variedade. Dentre eles, a RIDESA (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento Sucroalcooleiro), foi responsável por lançar as variedades RB036066, RB036088 e RB036091 no ano de 2015. As três variedades apresentam ótima brotação e perfilhamento em cana planta e cana soca e ótimo fechamento de entrelinhas (RIDESA 2015).

Os programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar podem ter como grande aliado os recursos de biotecnologia, para acelerar o processo de seleção ou até mesmo para produção de plantas geneticamente modificadas. Uma importante técnica para a produção de sementes sintéticas e plantas transgênicas é a embriogênese somática (ES), que induz uma acelerada produção de embriões somáticos potenciais para o encapsulamento ou para a introdução de um novo gene no DNA da planta alvo.

Na ES, células somáticas se diferenciam em embriões, apresentando-se morfológicamente semelhantes aos embriões zigóticos (Von Arnold 2008; Loyola-Vargas 2016). Em cana-de-açúcar o primeiro experimento utilizando esta técnica foi descrito por Heinz e Mee (1969), que testaram diferentes fontes de explante e diferentes concentrações de ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) em espécies do gênero *Saccharum* sp. utilizando meio de cultura com adição de água de coco. Na mesma linha, em 1983 Ahloowalia e Maretzki regeneraram plantas de cana, variedade IJ76-316, por ES, também com adição de 2,4-D em meio de cultura com água de coco. O uso da auxina sintética 2,4-D é comum para a indução e formação de calos em cana-de-açúcar, mas também há trabalhos com outros tipos de indutores, como thidiazuron (TDZ) que induziu a formação de calos embriogênicos e posterior regeneração de

plantas utilizando a variedade CP84-1198 (Gallo-Meagher et al. 2000). Trabalhos com o objetivo de visualizar as fases e transformações dos embriões somáticos foram realizados por Brisibe et al. (1993) que observaram a similaridade dos estágios embrionários somáticos com os zigóticos e evidenciaram a importância da técnica para formação de sementes sintéticas de cana-de-açúcar. Uma maneira alternativa de aumentar a indução de calos e regeneração foi investigado por Ferreira et al. (2017) que avaliaram a influência da luz LED (82% vermelho e 18% azul) na indução de calos embriogênicos (variedade RB98710), regeneração, multiplicação, enraizamento e estresse oxidativo durante a aclimatização.

Durante o processo de desdiferenciação e rediferenciação celular para a formação de embriões somáticos vários processos ocorrem e muitas dúvidas ainda estão sendo esclarecidas. Avaliações das alterações bioquímicas e moleculares foram realizadas por Heringer et al. (2015) que identificaram proteínas diferencialmente abundantes durante a maturação em calos embriogênicos e não embriogênicos na variedade SP80-3280. Entender como um sinal pode tornar uma célula somática em célula embriogênica e definir protocolos eficientes são um dos maiores gargalos da embriogênese somática, principalmente quando está associada a cana-de-açúcar, uma cultura que apresenta genoma poliplóide e uma grande variabilidade entre as variedades. Devido a esta grande variabilidade existe a necessidade da elaboração e otimização de protocolos eficientes para cada genótipo.

Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver protocolos de embriogênese somática para as variedades RB036066, RB036088 e RB036091 de cana-de-açúcar com o uso de 2,4-D e diferentes tipos de explante.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Local de realização dos experimentos

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Micropropagação de Plantas do Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade do Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.

3.2.2. Condições gerais de cultura *in vitro*

As culturas *in vitro* respectivas a cada experimento foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e quando expostas a luz, as

características eram, luz fluorescente branca fria, com densidade de fluxo de fótons de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas.

As placas de Petri utilizadas nos cultivos eram descartáveis e tinham 9 cm de diâmetro, 1,5 cm de altura e foi utilizado 20 ml de meio por placa. Os experimentos conduzidos em frascos tinham as seguintes características: frascos de vidro de 6 cm de diâmetro e 9 cm de altura, contendo 30 mL de meio de cultura cada um e fechados com tampa de polipropileno. Todas as placas e frascos utilizados foram vedados com filme PVC.

O meio de cultura base utilizado em todos os experimentos foi o MS (Murashige and Skoog 1962) compostos orgânicos e vitaminas. Todos os meios de cultura tiveram o pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem, e foram autoclavados durante 20 min a 120°C .

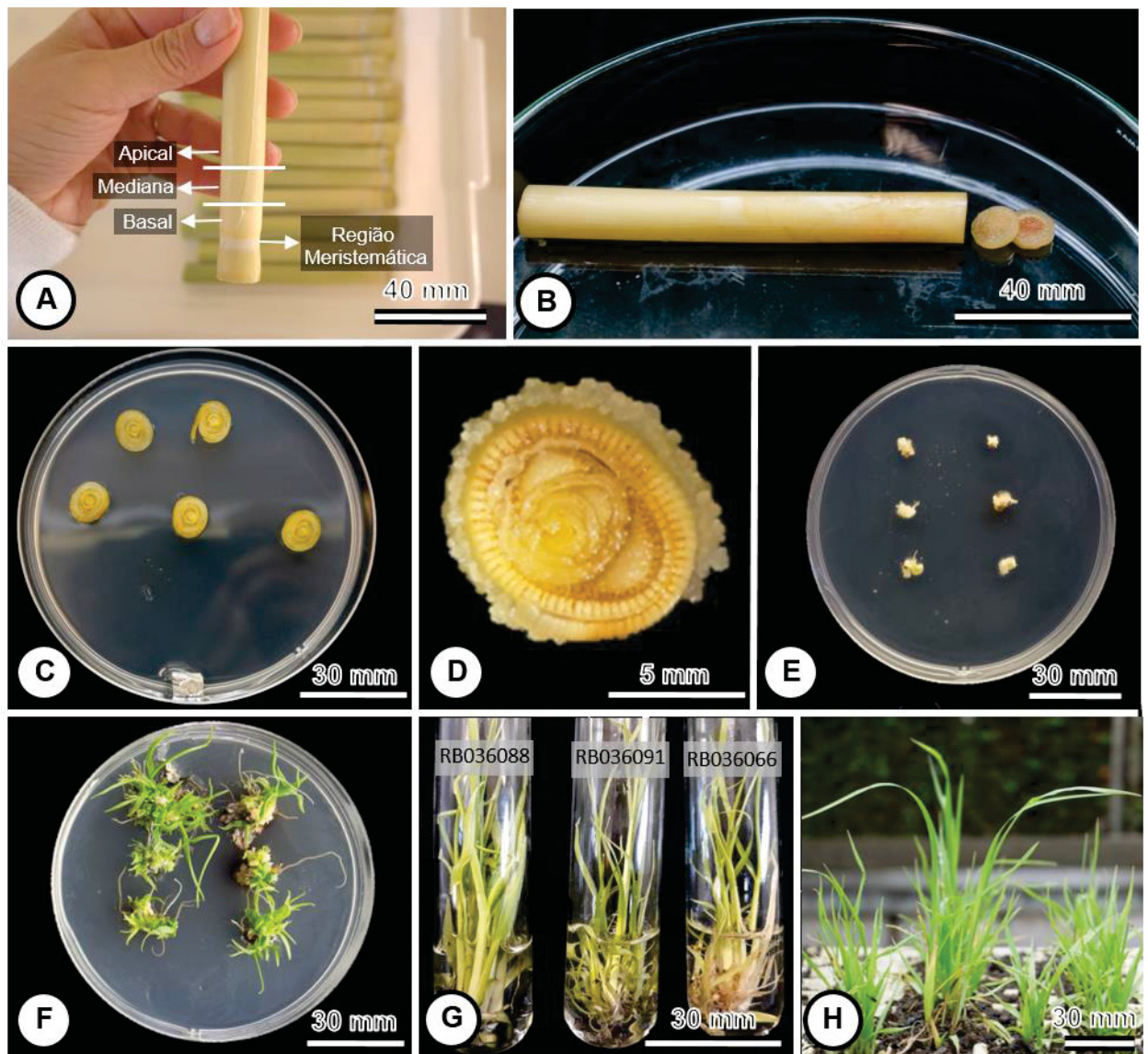
3.2.3. Embriogênese somática

Segmentos meristemáticos de folhas imaturas (palmitos) de cana-de-açúcar (variedades RB036066, RB036088, RB036091), de aproximadamente 8 meses de idade, foram coletados na unidade da RIDESA em Paranaíba, PR, Brasil. Em câmara de fluxo laminar, os palmitos foram desinfestados em álcool (70%) por 5 minutos e hipoclorito de sódio (2%) por 25 minutos, seguido de tríplice lavagem com água deionizada autoclavada. Após a assepsia, as pontas dos palmitos foram descartadas assim como a folha mais externa de cada um. Cada palmito de aproximadamente 5 cm foi seccionado transversalmente em discos de 2-3 mm a partir da base, totalizando 15 discos por palmito. Os discos foram separados em três tipos de explante, basal, mediano e apical, conforme indicados na FIGURA 5A e 5B.

Os discos foram dispostos em placas de Petri, 5 por placa (FIGURA 5C), contendo meio de cultura MS, suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose, $0,100 \text{ g L}^{-1}$ de mio-inositol, 6 g L^{-1} de ágar e as 5 concentrações de ácido diclorofenóxiacético (2,4-D), 0, 1, 3, 9 e $18 \mu\text{M}$, totalizando 15 tratamentos, com 5 placas cada. As placas de Petri contendo o material, para indução de calos, foram acondicionadas em sala de crescimento, no escuro, por 30 dias. Ao final deste período, avaliou-se a porcentagem de explantes com calos (FIGURA 5D). Depois de avaliados, os *clusters* de calos formados foram transferidos para uma nova placa contendo meio de cultura MS com as mesmas concentrações de 2,4-D para maturação e mantidas por mais 30 dias no escuro.

A conversão dos calos foi realizada em placas de Petri contendo meio de cultura MS acrescido de 30 g L^{-1} de sacarose, 6 g L^{-1} de ágar com 6 *clusters* de calos embriogênicos por placa (FIGURA 5E). Este material foi mantido em sala de crescimento sob luz, ao final deste período foi avaliado a taxa de conversão dos calos (FIGURA 5F).

FIGURA 5 - ETAPAS DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DAS VARIEDADES RB036088, RB036091 E RB036066 DE CANA-DE-AÇÚCAR. A) PALMITO DE CANA-DE-AÇÚCAR UTILIZADO PARA RETIRADA DOS EXPLANTES COM INDICAÇÕES DAS PORÇÕES BASAL, MEDIANA E APICAL. B) CORTE DOS DISCOS FOLIARES QUE FORAM UTILIZADOS COMO EXPLANTES. C) DISPOSIÇÃO DOS EXPLANTES EM PLACA DE PETRI. D) EXPLANTE COM PRESENÇA DE MASSA CALOSA APÓS 20 DIAS DE CULTIVO. E) *CLUSTERS* DE CALOS DISPOSTOS EM PLACA DE PETRI COM MEIO MS COM ADIÇÃO 30 g L^{-1} DE SACAROSE. F) CALOS EMBRIOGÊNICOS CONVERTIDOS EM MASSA VERDE. G) MULTIPLICAÇÃO DE PLÂNTULAS EM MEIO MS LÍQUIDO COM $0,46 \mu\text{M}$ KIN E $0,88 \mu\text{M}$ DE BAP. H) PLANTAS APÓS 10 DIAS DA ACLIMATIZAÇÃO.



FONTE: O autor (2019)

3.2.4. Análise citoquímica

Amostras dos calos selecionados como embriogênicos e não embriogênicos, obtidos ao final da fase de maturação, foram submetidos ao teste citoquímico de Carmin Acético para validação da classificação dos calos. As massas calosas foram coradas de acordo com Steiner et al. (2015) com Carmin Acético a 2% por 1 minuto e lavado com água destilada para remover o corante em excesso. Em seguida, o corante Azul de Evans 0,1% foi adicionado por 30 segundos e as amostras foram lavadas novamente. A coloração das células foi visualizada em microscópio estereoscópico (Leica®) e as imagens captadas em uma câmera fotográfica acoplada ao mesmo microscópio.

3.2.5. Multiplicação

Os *clusters* convertidos em plantas foram transferidos para meio de cultura MS líquido suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,46 µM de cinetina (KIN) e 0,88 µM de 6-benzilaminopurina (BAP) e mantidos em frascos na sala de crescimento. A cada 15 dias foram realizadas repicagens, totalizando três repicagens de cada variedade (FIGURA 5G).

3.2.6. Enraizamento e aclimatização

Para o enraizamento dos explantes foram testados em meio de cultura líquido com as seguintes composições: meio MS acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose; MS com metade dos sais (MS/2) e 30 g L⁻¹ de sacarose; MS com adição de 70 g L⁻¹ de sacarose e MS acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 2,46 µM de ácido-indolbutírico (AIB). Em 15 dias, avaliou-se o comprimento da maior raiz (cm) e área das raízes (cm²) pelo software ImageJ (Schneider; Rasband; Eliceiri, 2012). Foram aclimatizadas 10 plantas de cada tratamento e de cada variedade em casa de vegetação com nebulização intermitente, com controle automático de rega de 15 segundos a cada 30 minutos, o material foi plantado em bandejas de isopor com 128 células, substrato comercial RIGA® e ao final de 10 dias foi avaliada a taxa de sobrevivência de cada variedade (FIGURA 5H).

3.2.7. Análise estatística

Todo o experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado. A normalidade foi verificada pelo teste de Shapiro Wilk, a análise de variância foi

realizada para verificar diferenças significativas entre os tratamentos, as porcentagens dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey. Utilizou-se o programa estatístico R (R Development Core Team 2016).

3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1. Embriogênese somática

O uso da auxina sintética 2,4-D foi satisfatório para obtenção de calos nas três variedades estudadas. Esta primeira etapa é determinante para a embriogênese somática, a escolha do explante a ser utilizado, a composição do meio de cultura e o agente indutor de calos são de extrema importância para o método (Guerra et al. 1999, Loyola-Vargas 2016).

De acordo com a análise de variância não houve interação significativa entre o tipo de explante e a concentração de 2,4-D utilizada. Porém, houve diferença significativa entre os tipos de explante e entre as concentrações de 2,4-D para a variedade RB036066. Os tratamentos com 3 e 18 μM de 2,4-D apresentaram os maiores valores (65,6% e 62,6%), mas não diferiram significamente da concentração de 9 μM de 2,4-D (49,2%). Em relação ao tipo de explante utilizado, a porção do palmito basal e a mediana foram as que obtiveram a maior formação de calos por explante, 55,6% e 40% respectivamente (TABELA 1).

TABELA 1 - PORCENTAGEM DE EXPLANTES FOLIARES COM CALOS, CULTIVADOS EM MEIO MS, EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE 2,4-D E DO TIPO DE EXPLANTE UTILIZADO (AOS 60 DIAS DE CULTIVO) E CONVERSÃO DE CALOS (AOS 90 DIAS DE CULTIVO) DE CANA-DE-AÇÚCAR, VARIEDADE RB036066.

	Concentração de 2,4-D (μM)					Tipo de explante		
	0	1	3	9	18	Apical	Mediano	Basal
Explantos com calos	0,0 c	30,0 b	65,6 a	49,2 ab	62,6 a	35,4 b	40,0 ab	55,6 a
Calos Convertidos	-	94,3 a	83,3 ab	83,3 ab	50,0 b			

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Uma das grandes dificuldades na cultura de tecidos é obter um protocolo eficiente de propagação. Uma cultura como a cana-de-açúcar, que possui um genoma altamente complexo, esbarra em muitas variações entre os genótipos da mesma

espécie, levando a necessidade de se definir protocolos diferenciados para cada variedade (Lal et al. 2015, Nogueira et al. 2019). Como podemos observar no presente estudo houve variações nas respostas das variedades.

Para a variedade RB036088 também não houve interação significativa entre o tipo de explante e a concentração de 2,4-D utilizada para a porcentagem de explantes com calo e de calos convertidos em plantas. As maiores porcentagens de explantes com calo foram obtidas nas concentrações de 9 e 18 μM de 2,4-D (67,2% e 76,8%), mas não diferiram significativamente da concentração 3 μM de 2,4-D (50,6%) (TABELA 2). Mudry et al. (2013) obtiveram maior indução de massa calosa para a variedade RB966928 também em concentrações elevadas de 2,4-D (16 μM de 2,4-D).

Para o tipo de explante a resposta foi similar a variedade RB036066, com as porções basal superior a apical, mas sem diferir da mediana para a formação de calos.

TABELA 2 - PORCENTAGEM DE EXPLANTES FOLIARES COM CALOS, CULTIVADOS EM MEIO MS, EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE 2,4-D E DO TIPO DE EXPLANTE UTILIZADO (AOS 60 DIAS DE CULTIVO) E CONVERSÃO DE CALOS (AOS 90 DIAS DE CULTIVO) DE CANA-DE-AÇÚCAR, VARIEDADE RB036088.

	Concentração de 2,4-D (μM)					Tipo de explante		
	0	1	3	9	18	Apical	Mediano	Basal
Explantes com calos	0 c	24,0 bc	50,6 ab	67,2 a	76,8 a	28,0 b	39,0 ab	56,4 a
Calos Convertidos	-	54,2 ab	72,8 a	76,2 a	26,2 b			

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Na variedade RB036091 foi observada interação significativa entre as variáveis concentração e tipo de explante utilizado para a porcentagem de explantes com calo (TABELA 3). Para a porção apical do palmito as concentrações de 3, 9 e 18 μM de 2,4-D não apresentaram diferença significativa. A porção mediana do palmito, na concentração de 9 μM de 2,4-D, apresentou a maior porcentagem de explantes com calo, 52%, porém não se diferiu significativamente das concentrações 1, 3 e 18 μM de 2,4-D. A base do palmito, região mais próxima do meristema, obteve maior porcentagem de explantes com calos na concentração de 3 μM de 2,4-D (90%), porém não se diferiu significativamente das outras concentrações.

As concentrações de 1 e 3 μM de 2,4-D apresentaram diferença significativa em relação ao tipo de explante. A porção basal do palmito que apresentou a maior porcentagem de explantes com calos, 68% e 90% respectivamente, e foi significativamente superior as outras, nas duas concentrações. As demais concentrações não apresentaram diferença significativa para esta variável (TABELA 3).

TABELA 3 - PORCENTAGEM DE EXPLANTES FOLIARES COM CALOS, CULTIVADOS EM MEIO MS, EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE 2,4-D E DO TIPO DE EXPLANTE UTILIZADO (AOS 60 DIAS DE CULTIVO) E CONVERSÃO DE CALOS (AOS 90 DIAS DE CULTIVO) DE CANA-DE-AÇÚCAR DA VARIEDADE RB036091.

Concentração de 2,4-D (μM)	Tipo de Explante			Calos convertidos (%)
	Apical	Mediana	Basal	
0	0 bA	0 bA	20 bA	-
1	0 bB	4 abB	68 abA	47,50
3	12 abB	44 abB	90 aA	35,70
9	52 aA	52 aA	56 abA	27,70
18	52 aA	28 abA	60 abA	25

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Apesar da variabilidade genética da cultura e as respostas distintas de cada variedade para a porcentagem de explantes com calos, as três apresentaram resposta semelhante ao tipo de explante utilizado. Os explantes da porção basal do palmito foram em média 23% e 29% superiores aos explantes medianos e apicais, respectivamente, na formação de calos, uma das justificativas para tal fato é a proximidade da região ao meristema apical da planta. A região meristemática possui uma elevada concentração de citocinina endógena, que em contato com os níveis elevados de auxina exógena fizeram um balanço auxina-citocinina favorável à divisão celular (Taiz e Zeiger 2002; Lakshmanan et al. 2006). Além disso, células mais jovens tem maior competência embriogênica. Observando os valores encontrados para tipo de explante é visível que quanto mais distante do meristema menor a porcentagem de explantes com calos, as células mais distais possuem um potencial regenerativo reduzido (Lakshmanan et al. 2005). Ho e Vasil (1983) demonstraram que os explantes com 2,5 cm de distância do meristema apresentam em torno de 90% de indução de calos, a partir de 5 cm de distância a porcentagem cai para 40% no clone 68-1067 de cana-de-açúcar.

Em monocotiledôneas a competência embriogênica é mais restrita a células de origem embrionárias ou meristemáticas, porém células somáticas altamente especializadas podem ter competência induzida (Taiz e Zeiger 2002; Fehér et al. 2003). O início da via embriogênica é restrito apenas a certas células responsivas que têm o potencial de ativar os genes envolvidos na geração de células embriogênicas. Tem sido proposto que as células responsivas conteriam um grande número de receptores para os reguladores de crescimento presentes no meio de cultura, no caso auxinas. A regulação da resposta da planta é influenciada pela concentração de reguladores vegetais, alterações na sensibilidade e quantidade dos receptores nas células responsivas. Esta é uma das hipóteses para a variação da competência embriogênica de explantes (Guerra et al. 1999; Von Arnold 2008).

Lakshmanan et al. (2005) testaram três fontes de explantes, proximal, mediano e distal em relação ao meristema para cana-de-açúcar e obtiveram resultados similares aos descritos neste trabalho, quanto mais próximo da região meristemática maior o número de explantes com calos. Lakshmanan et al. (2005) sugerem que possivelmente as células morfogenicamente competentes nos explantes de segmentos distais possam ter um nível reduzido de competência e, conseqüentemente, um nível mais elevado de sinal indutivo é necessário para torná-las embriogênicas. Isso reforça os resultados encontrados neste trabalho, as concentrações de 9 e 18 μM de 2,4-D formaram mais de 40% de explantes com calos, para a variedade RB036091, no segmento apical do palmito quando comparado as concentrações de 1 e 3 μM de 2,4-D.

A presença de regulador vegetal no meio de cultura é fundamental para a embriogênese somática, como foi observado no tratamento sem adição de 2,4-D, que praticamente não houve formação de calos. Dewanti et al. (2016) e Alcantara et al. (2014) também demonstraram que a ausência de 2,4-D é desfavorável à embriogênese somática.

O uso de auxina, principalmente 2,4-D, como agente indutor da embriogênese somática é amplamente utilizado para diversas culturas, como exemplo arroz (Ahmad et al., 2013), milho (Lucena et al., 2015), trigo (Seldimirova et al. 2019) e soja (Raza et al. 2020). Na maior parte das culturas apenas o uso de uma auxina é suficiente para estimular a totipotência celular, porém algumas espécies necessitam da combinação de diferentes auxinas ou a combinação auxina-citocinina (Von Arnold 2008). O balanço auxina e citocinina pode regular a morfogênese vegetal e, em alguns casos,

pode ser o fator determinante da resposta da embriogênese por participar diretamente na regulação do ciclo e na divisão celular (Taiz et al. 2017). Em cana-de-açúcar Alcantara et al. (2014) testaram meio MS com 2,4-D e diferentes combinações das citocininas BAP e KIN para as variedades RB855156 e RB72454, foi observado que o meio MS com 13,5 μM de 2,4-D apresentou as maiores porcentagens de indução de calos, 70% e 65% respectivamente. Raza et al. (2012) testaram meio MS com 2,4-D, MS com KIN e diferentes combinações dos dois reguladores para a variedade BL4, notou-se que apenas KIN no meio não formou calos e que altas concentrações de KIN (9 e 18 μM) em combinações com 2,4-D teve efeito inibitório na formação de calos, a maior quantidade de indução de calos foi no meio MS com 4,5, 9 e 18 μM de 2,4-D.

Uma auxina exógena forte aumenta a concentração de auxina endógena, que vai atuar na reprogramação gênica do tecido somático (Nic-Can e Loyola-Vargas 2016). A forma como a auxina atua ainda não está bem esclarecida. Uma das hipóteses é de que a auxina influencia na metilação do DNA para que haja uma reprogramação gênica embrionária (Von Arnold 2008).

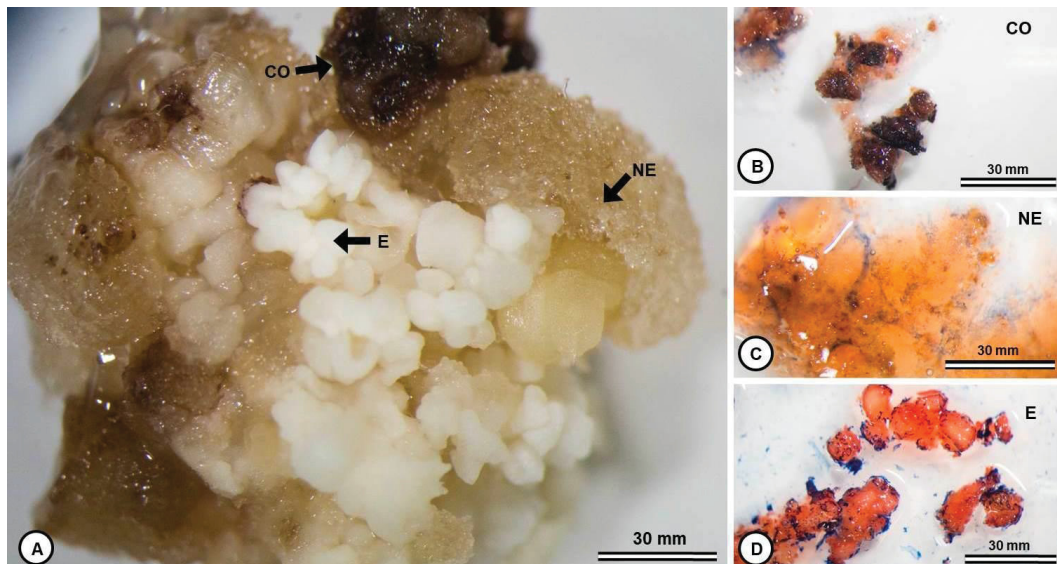
A auxina tem uma ação de extrema importância na embriogênese somática, pois desempenha um papel importante no desenvolvimento da polaridade na estrutura do embrião, sendo a padronização apical-basal durante a embriogênese determinante para a obtenção de embriões somáticos normais (Larsson et al. 2008; Filonova et al. 2000). Entretanto, devem se manter níveis baixos de concentrações de auxinas para garantir a formação de embriões normais em várias espécies de plantas (Abrahamsson et al. 2012).

Os calos embriogênicos de cana-de-açúcar (FIGURA 6A) se caracterizam por serem compactos e lisos, são formados por células com características embriogênicas, já os não embriogênicos são friáveis ou macios e translúcidos (Lakshmanan et al. 2006, Ho e Vasil 1983). Histologicamente os calos embriogênicos apresentam células com formato arredondado, núcleos proeminentes, alto índice núcleo:citoplasma, pequenos vacúolos e estruturas globulares organizadas. Já os não embriogênicos apresentam células dispersas, alongadas e vacuoladas, com uma baixa relação núcleo:citoplasma (Silveira et al. 2013).

As massas calosas podem ser distinguidas também por características citoquímicas, células que reagem fortemente ao corante Carmin Acético e fracamente ao corante Azul de Evans são embriogênicas (Guerra et al. 1999). A cor vermelha observada nas massas que reagiram com o Carmin indica fortemente o potencial

embriogênico do material (Gupta e Durzan, 1987). Na FIGURA 6 é possível visualizar que o teste de coloração indicou a presença de células embriogênicas e apresentou algumas das diferenças entre os calos embriogênicos e não embriogênicos obtidos neste estudo. As massas consideradas embriogênicas pela sua morfologia em contato com o Carmin Acético apresentaram coloração vermelho intenso e uma formação de calos mais uniforme e de característica arredondada (FIGURA 6D). Os calos considerados não embriogênicos pela morfologia apresentaram coloração alaranjada e formação desuniforme com aspecto gelatinoso, a cor alaranjada demonstra que as células do material têm um baixo potencial embriogênico (FIGURA 6C). O teste também foi realizado com massas que apresentavam oxidação, e mesmo com oxidação presente foi possível perceber uma leve coloração avermelhada em alguns pontos (FIGURA 6B), mostrando que estas células estão perdendo o potencial embriogênico.

FIGURA 6 - ASPECTOS DA MORFOGÊNESE DE CALOS DE CANA-DE-AÇÚCAR COM 55 DIAS DE CULTIVO. A) MASSA CALOSA EM MEIO DE CULTURA COM 9 μ M DE 2,4-D DESTACANDO CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS (E), CÉLULAS NÃO EMBRIOGÊNICAS (NE) E CÉLULAS OXIDADAS (CO). B) TESTE CITOQUÍMICO CARMIN ACÉTICO E AZUL DE EVANS EM CÉLULAS OXIDADAS. C) TESTE CITOQUÍMICO CARMIN ACÉTICO E AZUL DE EVANS EM CÉLULAS NÃO EMBRIOGÊNICAS. D) TESTE CITOQUÍMICO CARMIN ACÉTICO E AZUL DE EVANS EM CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS.



FONTE: O autor (2019)

A presença de calos embriogênicos é fundamental para a conversão dos calos em massa verde, assim um número elevado de calos não é necessariamente uma forma de prever o sucesso da embriogênese somática. As concentrações de 2,4-D

que induziram a maior formação de calos não foram as mesmas que apresentaram uma melhor conversão de calos. As variedades RB036066 e RB036091 apresentaram maior porcentagem de conversão de calos na concentração de 1 μM de 2,4-D (94,3% e 47,5%). Mas, para a variedade RB036066, a concentração de 1 μM não diferiu significativamente das concentrações 3 e 9 (TABELA 1) e para a variedade RB036091, não diferiu das outras concentrações (TABELA 3). Já para a variedade RB036088 a porcentagem de calos convertidos foi superior nas concentrações de 3 e 9 μM de 2,4-D (72,8% e 76,2%) e não diferiram da concentração de 1 μM (TABELA 2).

O uso do 2,4-D na embriogênese somática é muito eficiente para indução de calos, porém para conversão é necessário cultivá-los em ausência de auxinas, pois o 2,4-D bloqueia a progressão e desenvolvimento do embrião (Fehér 2005). Com a retirada da auxina o bloqueio na expressão de genes necessários para a transição para estágio seguinte é liberada (Von Arnold 2008). A retirada do 2,4-D do meio de cultura para a conversão de calos de cana-de-açúcar é comumente utilizada como descrito nos trabalhos de Alcantara et al. (2014), Lakshmanan et al. (2006), Mudry et al. (2013), Ferreira et al. (2017) e Kaur e Kapoor (2016). Os autores Heringer et al. (2015) e Silveira et al. (2013) relataram o uso de carvão vegetal no meio de cultura para diminuir o efeito residual do 2,4-D.

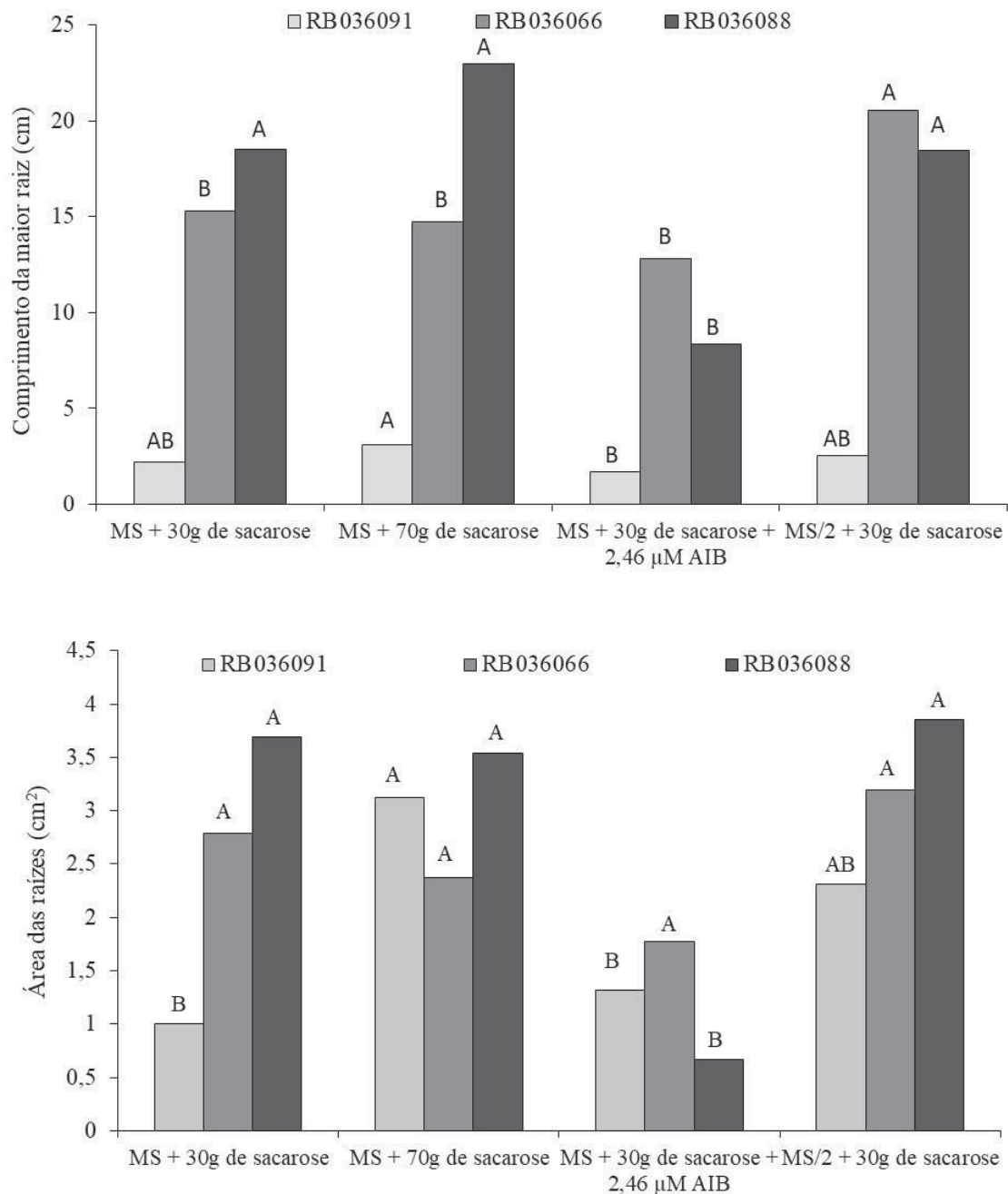
Ho e Vasil (1983) relatam que o 2,4-D, utilizado em altas concentrações no meio de cultura, acarreta na formação de calos não-embriogênicos. A quantidade ou tempo de exposição do material com 2,4-D em excesso, podem modificar a sequência gênica, logo a expressão celular, reprogramando genes específicos da embriogênese somática comprometendo a capacidade embriogênica da célula (Karami e Saidi 2010). Na Tabela 1 e 3, pode-se observar que houve maior taxa de conversão dos calos no tratamento que ofereceu uma menor concentração de 2,4-D no meio.

3.4.2. Enraizamento

O enraizamento de espécies herbáceas é relativamente fácil, comumente se utiliza meio de cultura com concentração de sais reduzida. Para estas espécies recomenda-se não utilizar auxina ou utilizá-la em concentrações baixas, já que o rápido crescimento da parte aérea é uma fonte intensa de produção de auxina, que translocada para a base estimula a rizogênese (Grattapaglia e Machado 1998). A variedade RB036066 manteve este padrão de comportamento, obteve maior comprimento (20,54 cm) de raízes no meio de cultura com metade dos sais do MS.

Porém, não apresentou diferença estatística para a área das raízes nos diferentes tratamentos.

FIGURA 7 - EFEITO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA PARA ENRAIZAMENTO DAS VARIEDADES RB036091, RB036066 E RB036088 DE CANA-DE-AÇÚCAR COM 15 DIAS DE CULTIVO. A) COMPRIMENTO DA MAIOR RAIZ, B) ÁREA DAS RAÍZES (CM²). CULTIVO NOS MEIOS DE CULTURA MS, MS COM ADIÇÃO DE 70G L⁻¹ DE SACAROSE, MS COM 2,46 μM DE AIB E MS COM METADE DOS SAIS. MÉDIAS SEGUIDAS PELA MESMA LETRA MAIÚSCULA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE TUKEY P <0,01.



FONTE: O autor(2020)

Diferentemente, para o comprimento da maior raiz e área das raízes, das variedades RB036088 e RB036066, não houve diferença estatística entre os tratamentos (FIGURA 7).

A disponibilidade de uma fonte de energia é indispensável para a rizogênese, para a formação de raízes existe a necessidade de energia e carboidratos, que na micropropagação são oriundos de uma fonte externa. O carbono exógeno no meio serve como fonte de energia influenciando na fisiologia da planta, diferenciação, indução e formação de órgãos (Mothé et al. 2008; Calvete et al. 2002). Em cana-de-açúcar Khan et al. (2006) e Kaur e Kapoor (2016), relataram o uso de 60 e 70 g L⁻¹ de sacarose em combinação com auxinas para enraizamento.

TABELA 4 - TAXA DE SOBREVIVÊNCIA DAS VARIEDADES RB036091, RB036066 E RB036088 EM FUNÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA PARA ENRAIZAMENTO. CULTIVO NOS MEIOS DE CULTURA MS, MS COM ADIÇÃO DE 70G L⁻¹ DE SACAROSE, MS COM 2,46 µM DE AIB E MS COM METADE DOS SAIS.

Tatamentos	Taxa de sobrevivência		
	RB036091	RB036066	RB036088
MS	90%	30%	100%
MS + 70g de sacarose	100%	80%	100%
MS + 2,46 µM de AIB	100%	80%	100%
MS/2	100%	100%	100%

Capellades et al. (1991) propõe que altas concentrações de sacarose no meio de cultura aumentam o acúmulo de amido nas folhas que podem funcionar como órgãos de reserva, liberando energia durante a aclimatização. No caso das variedades RB036091 e RB036088 a taxa de sobrevivência na aclimatização foi de 100% para o tratamento MS com adição de 70g L⁻¹ (TABELA 4). Por outro lado, o uso de concentrações elevadas de sacarose no enraizamento pode ser prejudicial para o condicionamento das plantas ao estado fotoautotrófico durante a aclimatização, como para a variedade RB036066 que apresentou 80% de taxa de sobrevivência.

O processo de formação de raízes pode ser dividido em indução, iniciação e alongamento, as duas primeiras fases são dependentes de auxina e o alongamento é inibido pela presença de auxinas (Taiz et al. 2017). O meio de cultura MS acrescido de 2,46 µM de AIB de maneira geral apresentou as menores médias para as três variedades, possivelmente o AIB teve um efeito inibitório no crescimento das raízes.

Porém quando os explantes foram aclimatizados a taxa de sobrevivência foi de 100% para as variedades RB036088 e RB036091 e de 80% para a RB036066, possivelmente com a retirada do AIB houve o crescimento das raízes. Divergindo destes resultados, Alcantara et al. (2014) relataram êxito no enraizamento com o uso de 2,5 μM de AIB para a variedade RB855156 e 5,0 μM de AIB para a RB72454.

Em contrapartida o meio de cultura apenas com MS apresentou a menor taxa de sobrevivência para a variedade RB036066, 30% de plantas vivas, a alta concentração de sais tende a inibir todas as fases do enraizamento. Entretanto, para as outras variedades a taxa de sobrevivência foi de 100% para RB036088 e de 90% para a RB036091.

3.6. CONCLUSÕES

Nas condições do presente trabalho foi concluído que o uso de 2,4-D é fundamental para a indução de calos nas 3 variedades estudadas. A região basal do palmito apresenta maior capacidade de regeneração. Para a indução de calos e conversão nas variedades RB036066 e RB036091 recomenda-se a concentração de 3 μM de 2,4-D e para a variedade RB036088 a concentração de 9 μM de 2,4-D. A conversão de calos deve ser realizada na ausência de 2,4-D e a multiplicação dos brotos em 0,46 μM de cinetina (KIN) e 0,88 μM de 6-benzilaminopurina (BAP) para as 3 variedades. O enraizamento no meio MS com adição de 70 g L⁻¹ de sacarose para as variedades RB036088 e RB036091 e o meio MS com metade da concentração de sais para a variedade RB036066 foram os mais favoráveis ao enraizamento e aclimatização das variedades.

REFERÊNCIAS

- Abrahamsson, Malin, Silvia Valladares, Emma Larsson, David Clapham, and Sara von Arnold. 2012. Patterning during somatic embryogenesis in Scots pine in relation to polar auxin transport and programmed cell death. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 109: 391–400. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-0103-8>.
- Ahloowalia, B. S., and A. Maretzki. 1983. Plant regeneration via somatic embryogenesis in sugarcane. *Plant Cell Reports* 2: 21–25.
- Ahmad, Fauziah Illyas, Nur Shafiqoh Johan, and Alina Wagiran. 2013. Effect of 2,4-D on Embryogenic Callus Induction of Malaysian indica Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars MR123 and MR127. *Jurnal Teknologi* 64: 75–78.

- Alcantara, Giovana Bomfim de, Roberson Dibax, Ricardo Augusto De Oliveira, João Carlos Bespalhok Filho, and Edelclaiton Daros. 2014. Plant regeneration and histological study of the somatic embryogenesis of sugarcane (*Saccharum* spp.) cultivars RB855156 and RB72454. *Acta Scientiarum. Agronomy* 36: 63. <https://doi.org/10.4025/actasciagr.v36i1.16342>.
- Brisibe, Ebiamadon Andi, Daisuke Nishioka, Hiroshi Miyake, and Takeshi Taniguchi. 1993. Developmental electron microscopy and histochemistry of somatic embryo differentiation in sugarcane. *Plant Science* 89: 85–92.
- Calvete, Eunice Oliveira, Atelene Normann Kampf, Homero Bergamaschi, and Rafael Henrique Schuur Daudt. 2000. Avaliação do crescimento de plantas de morangueiro durante a aclimatização ex vitro. *Horticultura brasileira* 18: 188–192.
- Capellades, Montserrat, Raoul Lemeur, and Pierre Debergh. 1991. Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *Rosa* cultured in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 25: 21–26. <https://doi.org/10.1007/BF00033908>.
- Dewanti, Parawita, Laily Ilman Widuri, Choirul Ainiyati, Purnama Okviandari, Maisaro, and Bambang Sugiharto. 2016. Elimination of SCMV (Sugarcane Mozaik Virus) and Rapid Propagation of Virus-free Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Using Somatic Embryogenesis. *Procedia Chemistry* 18: 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2016.01.016>.
- Fehér, Attila. 2005. Why somatic plant cells start to form embryos? *Plant Cell Monographs* 2: 85–101. https://doi.org/10.1007/7089_019.
- Fehér, Attila, Taras P. Pasternak, and Dénes Dudits. 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74: 201–228. <https://doi.org/10.1023/A:1024033216561>.
- Ferreira, Lais Tomaz, Marina Medeiros de Araújo Silva, Cláudia Ulisses, Terezinha Rangel Camara, and Lilia Willadino. 2017. Using LED lighting in somatic embryogenesis and micropropagation of an elite sugarcane variety and its effect on redox metabolism during acclimatization. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 128. Springer Netherlands: 211–221. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1101-7>.
- Filonova, Lada H, Peter V Bozhkov, Vladimir B Brukhin, Geoffrey Daniel, Boris Zhivotovsky, and Sara von Arnold. 2000. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. *Journal of Cell Science* 113: 4399–4411. <https://doi.org/10.1002/chem.201103517>.
- Gallo-Meagher, M., R G English, and A Abouzid. 2000. Thidiazuron stimulates shoot regeneration of sugarcane embryogenic callus. *In Vitro Cell. Dev. Biol* 36: 37–40.
- Grattapaglia, Dario, Marcos A. Machado. Micropropagação. 1998. Micropropagação. In: *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*, ed. Antônio Carlos Torres, Linda Styer Caldas, José Amauri Buso, 183-260. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa – CNPH.
- Guerra, Miguel Pedro, Antônio Carlos Torres, João Batista Teixeira. 1999. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: *Cultura de tecidos e*

transformação genética de plantas, ed. Antônio Carlos Torres, Linda Styer Caldas, José Amauri Buso, 533-568. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa – CNPH.

Gupta, Pramod K., and Don J. Durzan. 1987. Somatic embryos from protoplasts of loblolly pine proembryonal cells. *Bio/Technology* 5: 710–712. <https://doi.org/10.1038/nbt0787-710>.

He, D. G., G. Tanner, and K. J. Scott. 1986. Somatic embryogenesis and morphogenesis in callus derived from the epiblast of immature embryos of wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Science* 45: 119–124. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(86\)90047-6](https://doi.org/10.1016/0168-9452(86)90047-6).

Heinz, Don J, and Grace W P Mee. 1969. Plant Differentiation from Callus Tissue of *Saccharum* Species. *Crop Science* 9: 3–5.

Heringer, Angelo Schuabb, Tatiana Barroso, Amanda Ferreira Macedo, Claudete Santa-, Gustavo Henrique, Martins Ferreira, Eny lochevet, and Segal Floh. 2015. Label-Free Quantitative Proteomics of Embryogenic and Non-Embryogenic Callus during Sugarcane Somatic Embryogenesis. *Plos One* 10: 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127803>.

Ho, Wai Jane, and Indra K. Vasil. 1983. Somatic Embryogenesis in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) I. The Morphology and Physiology of Callus Formation and the Ontogeny of Somatic Embryos. *Protoplasma* 118: 169–180.

Karami, Omid, and Abbas Saidi. 2010. The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. *Molecular Biology Reports* 37: 2493–2507. <https://doi.org/10.1007/s11033-009-9764-3>.

Kaur, Rupinder, and Manish Kapoor. 2016. Plant Regeneration Through Somatic Embryogenesis in Sugarcane. *Sugar Tech* 18: 93–99. <https://doi.org/10.1007/s12355-015-0380-3>.

Khan, Imtiaz Ahmed, M Umar Dahot, Shafqat Yasmin, Abdullah Khatri, Nighat Seema, and Mazhar H Naqvi. 2006. Effect of sucrose and growth regulators on the micropropagation of sugarcane clones. *Pak. J. Bot.* 38: 961–967.

Lakshmanan, Prakash, R Jason Geijskes, Karen S. Aitken, Christopher P L Grof, Graham D. Bonneti, and Grant R Smith. 2005. Sugarcane Biotechnology: The Challenges and Opportunities. *In Vitro Cell. Dev. Biol* 41: 345–363. <https://doi.org/10.1079/IVP2005643>.

Lakshmanan, Prakash, R Jason Geijskes, Lifang Wang, Adrian Elliott, Christopher P L Grof, Nils Berding, and Grant R Smith. 2006. Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp . interspecific hybrids) leaf culture. *Cell biology and morphogenesis* 25: 1007–1015. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0154-1>.

Lal, M, A K Tiwari, and G N Gupta. 2015. Commercial Scale Micropropagation of Sugarcane : Constraints and Remedies. *Sugar Tech* 17: 339–347. <https://doi.org/10.1007/s12355-014-0345-y>.

Larsson, Emma, Folke Sitbon, Karin Ljung, and Sara Von Arnold. 2008. Inhibited

- polar auxin transport results in aberrant embryo development in Norway spruce. *New Phytologist* 177: 356–366. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02289.x>.
- Loyola-Vargas, Víctor M. Loyola-Vargas, and Neftalí Ochoa-Alejo Ochoa-Alejo. 2016. Somatic Embryogenesis. An Overview. In *Somatic Embryogenesis : Fundamental Aspects and Applications*, ed. Víctor Loyola-Vargas M. and Neftalí Ochoa-Alejo, 1–10. Springer Switzerland. <https://doi.org/1007/978-3-319-33705-0>.
- Lucena, Ana Luisa Monezi, Inove Batista de Oliveira Eloi, Claudete Aparecida Mangolin, and Maria de Fátima Pires da Silva Machado. 2015. Embriogênese Somática em Milho: Trajetória e Eficiência. *Plant Cell Cult. Micropropag.* 11: 33–53.
- Mothé, Geórgia Peixoto Bechara, Alena Torres Netto, Luis Eduardo Campos Crespo, Eliemar Campostrin Crespo. 2008. Eficiência fotoquímica e características de crescimento da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) cultivada *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose e qualidade de luz. *Plant Cell Culture Micropropagation* 4: 84-91.
- Mudry, Clarissa de Souza, Diego Kyochi Katayama De Souza, Roberson Dibax, Giovana Bomfim De Alcântara, and João Carlos Bepalhok Filho. 2013. Embriogênese somática da cultivar RB966928 e do clone RB986419 de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). *Semina: Ciências Agrárias* 34: 1023–1032. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n3p1023>.
- Murashige, Toshio, and Folke Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tabacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497.
- Nic-Can, G.I., Loyola-Vargas, V.M. (2016). The Role of the Auxins During Somatic Embryogenesis. In: Loyola-Vargas, V., Ochoa-Alejo, N. (eds) *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0_10
- Nogueira, Gabriela Ferreira, Zanderluce Gomes Luis, Moacir Pasqual, and Jonny Everson Scherwinski-Pereira. 2019. High-efficiency somatic embryogenesis of a broad range of Brazilian *Saccharum* spp. hybrids (sugarcane) varieties using explants from previously established *in vitro* plants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 55: 26–35. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-09954-2>.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM (2016) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Raza, Ghulam, Mohan B. Singh, and Prem L. Bhalla. 2020. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Tritordeum. *Plants* 9: 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1989.tb00377.x>.
- Raza, Saboohi, Syeda Qamarunisa, Mushtaq Hussain, Ishrat Jamil, Sadia Anjum, Abid Azhar, and Javed Ahmed Qureshi. 2012. Regeneration in sugarcane via somatic embryogenesis and genomic instability in regenerated plants. *Journal of Crop Science and Biotechnology* 15: 131–136. <https://doi.org/10.1007/s12892-011-0111-6>.

RIDESA. 2015. Liberação Nacional de Variedades “RB” de cana-de-açúcar. Curitiba: Editora Graciosa.

Schneider, Caroline, A., Rasband, Wayne, S. and Eliceiri, Kevin, W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. doi:10.1038/nmeth.2089

Seldimirova, O. A., G. R. Kudoyarova, N. N. Kruglova, I. R. Galin, and D. S. Veselov. 2019. Somatic Embryogenesis in Wheat and Barley Calli in vitro Is Determined by the Level of Indoleacetic and Abscisic Acids. *Russian Journal of Developmental Biology* 50: 124–135. <https://doi.org/10.1134/s1062360419030056>.

Silveira, Vanildo, Aline Martins de Vita, Amanda Ferreira Macedo, Maria Fernanda Ribeiro Dias, Eny lochevet Segal Floh, and Claudete Santa-Catarina. 2013. Morphological and polyamine content changes in embryogenic and non-embryogenic callus of sugarcane. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 114: 351–364. <https://doi.org/10.1007/s11240-013-0330-2>.

Steiner, Neusa, Francine L. Farias-Soares, Éder C. Schmidt, Maria L.T. Pereira, Bruna Scheid, Gladys D. Rogge-Renner, Zenilda L. Bouzon, Daniela Schmitz, Sara Maldonado, and Miguel P. Guerra. 2015. Toward establishing a morphological and ultrastructural characterization of proembryogenic masses and early somatic embryos of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (Protoplasma, (2016), 253, (487-501), 10.1007/s00709-015-0827-0). *Protoplasma* 254: 1467. <https://doi.org/10.1007/s00709-017-1080-5>.

Taiz, Lincon, Eduardo Zeiger. 2002. *Fisiologia Vegetal*. Massachusetts: Sinauer Associates. p. 517-540.

Taiz, L.; Zeiger, E.; Moller, I. M.; Murphy. A. *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*, 6ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2017.

UNICA. 2016. *Setor sucroenergético no Brasil uma visão para 2030*. Ministério de Minas e Energia.

Von Arnold, S. 2008. Somatic Embryogenesis. In *Plant Propagation by Tissue Culture*, ed. Edwin F. George, Michael A. Hall, and Geert-Jan De Klerk, 3rd ed., 335–350. Dordrecht: Springer

4 CAPÍTULO II: TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE CANA-DE-AÇÚCAR, VARIEDADE RB036088, UTILIZANDO O GENE *P5CS* PARA TOLERÂNCIA AO ESTRESSE HÍDRICO

RESUMO

O estresse hídrico afeta diretamente a cana-de-açúcar, prejudicando a produtividade e restringindo a sua expansão para áreas com irregularidades de chuvas e sem irrigação. Para mitigar os danos causados pelo estresse hídrico, o gene *P5CS* de *Vigna aconitifolia* tem sido inserido em diferentes espécies para incremento no teor de prolina visando o efeito osmoprotetor e osmoregulador. Assim, a construção pJS107, contendo o gene *P5CS* sob controle do promotor estresse induzido AIPC e tendo o gene *bar* como marcador de seleção, foi inserida em embriões somáticos de cana-de-açúcar, variedade RB036088, objetivando a integração via biobalística. Para a biobalística foram utilizadas micropartículas de tungstênio, pressão de ruptura de 1.200 psi e distância entre o macrocarreador e material vegetal de 12 cm. A eficiência da transformação considerando os putativos selecionados em meio seletivo foi de 3%. Foram obtidos eventos, confirmados por PCR pela amplificação gene de seleção *bar*. Porém, eles não apresentaram sinal de expressão do gene *bar* na PCR em tempo real e não houve biossíntese de prolina superior ao controle negativo quando os eventos foram expostos, *in vitro*, a situação de estresse (-0,9 Mpa). O método utilizado para transformação dos embriões foi eficiente, porém o conteúdo de prolina nos eventos foi inferior ao esperado.

Palavras-chave: *Saccharum spp.*, Prolina, Biobalística, Embriogênese Somática.

ABSTRACT

The drought stress directly affects sugarcane, harming productivity and restricting its expansion to areas with irregular rainfall and water-limited environments. To mitigate the damage caused by drought stress, the P5CS gene from *Vigna aconitifolia* has been inserted in different species to increase the proline content, aiming at the osmoprotective and osmoregulatory effect. Thus, the pJS107 construct containing the P5CS gene under the control of the AIPC-induced stress promoter and the bar gene as a selection marker, was inserted in sugarcane, RB036088, embryogenic calli, aiming at the integration via biolistics. For biolistics, were used tungsten microparticles, burst pressure of 1,200 psi and distance between the macrocarrier and plant material of 12 cm. The transformation efficiency considering the putatives selected in selective medium was 3%. They were obtained events, confirmed by PCR through selection gene bar amplification. However, they do not presented the gene bar expression signal on real time PCR and there was not proline biosynthesis superior of negative control when the events were exposed, in vitro, to stress situation (-0.9 Mpa). The method used for embryo transformation was efficient, however the quantity of proline in the events was less than expected.

Key words: *Saccharum spp.*, Proline, Biolistics, Somatic embryogenesis

4.1. INTRODUÇÃO

O estresse hídrico causa grandes perdas para agricultura. Esse é o fator ambiental mais limitante para a produtividade das culturas. A restrição hídrica afeta os processos fisiológicos, bioquímicos e morfológicos das plantas, consequentemente causando o declínio da produção (BASU et al., 2016).

As preocupações com as alterações climáticas e a necessidade de aumento de produtividade sinalizam para essa questão. Pesquisas com esta temática são recorrentes para diferentes culturas como, arroz, milho, algodão e trigo (WEBBER et al., 2018; ZHANG et al., 2018; MAHMOOD et al., 2019; KIM et al., 2020). Para a cana-de-açúcar não é diferente, estudos com o objetivo de entender o perfil gênico durante o estresse hídrico, as mudanças fisiológicas e as perspectivas futuras para a cultura diante de situações de escassez hídrica estão sendo realizados. A busca pela compreensão do comportamento das plantas e como aumentar a tolerância ao estresse são importantes para manter a produtividade da cana-de-açúcar (LAKSHMANAN; ROBINSON, 2014; zhanget al., 2016; FERREIRA, et al., 2017).

A queda na produtividade da cana-de-açúcar devido ao estresse hídrico é uma realidade para os produtores. A safra 2018/2019 da cultura apresentou redução de 1,2 ton/ha na produtividade em relação à safra anterior, devido a irregularidade de chuvas (CONAB, 2018). Além de reduzir a produção, o estresse hídrico impede a expansão do plantio para áreas com irregularidade de chuvas sem o uso de irrigação.

A cana-de-açúcar é uma cultura exigente em água, com uma média de 1.500 a 2.000 mm de chuvas anualmente. As fases do desenvolvimento mais críticas são perfilhamento e crescimento vegetativo (DOORENBOS; KASSAM, 1979). Para um crescimento rápido e intenso há necessidade de boa disponibilidade hídrica. O comprimento dos internódios e a altura das plantas são sensíveis e ficam prejudicados em situação de estresse, afetando diretamente a produtividade e a eficiência industrial da cultura (PIRES; ARRUMA; SAKI, 2008). O estresse hídrico é benéfico para a cana-de-açúcar no período de maturação, quando as plantas passam a acumular açúcar nos colmos, porém quando a maturação é antecipada devido a irregularidade de chuvas, a colheita é realizada com plantas com internódios curtos, mais baixas e menos produtivas.

Um dos objetivos do melhoramento genético é desenvolver variedades tolerantes ao estresse hídrico, característica complexa, uma vez que envolve diversos genes. Uma das ferramentas para auxiliar o melhoramento é a transformação genética, que possibilita a introdução de um gene de interesse no DNA vegetal (HUSSAIN; KAYANI; AMJAD, 2011; SANTOS et al., 2019). A cana-de-açúcar transgênica tolerante ao estresse hídrico já é uma realidade, a Indonésia possui 2.000 hectares de cana-de-açúcar plantados, variedade NXI-4T, liberada para cultivo comercial no país desde 2018 (ISAAA, 2019; LAJOLO; YOKOYAMA; CHEAVEGATTI GIANOTTO, 2021).

As transformações genéticas para a tolerância ao estresse hídrico têm seguido linhas diferentes, como a introdução de genes da família *DREB* que atuam na ativação de genes funcionais relacionados a tolerância ao estresse, genes supressores de morte celular, como o *AtBl-1*, genes para superexpressão de solutos compatíveis, como o *RmBeta* que regula a produção de glicina betaína e o *P5CS*, que é responsável pela regulação da prolina. A prolina por sua vez, é um aminoácido que durante o estresse hídrico tem papel de osmoprotetor e osmorregulador (RAMIRO et al., 2016; BALESTRO et al., 2017; ZHAO et al., 2020; BABU et al., 2021).

A prolina é capaz de reduzir o conteúdo de espécies reativas ao oxigênio (EROS) e de manter o turgor das células durante o período de estresse. Com características de solutos compatíveis, também, proporciona uma fonte de carbono e nitrogênio para as células ao final do período de estresse (VERSLUES; SHARMA, 2010; TAIZ et al., 2017).

A transformação genética visando o aumento do conteúdo de prolina tem demonstrado eficácia na tolerância ao estresse hídrico da cana-de-açúcar. Molinari et al. (2007) transformaram a variedade RB855156 utilizando o gene *P5CS* de *Vigna aconitifolia* e concluíram que a superprodução de prolina protegeu as plantas contra o estresse oxidativo causado pelo déficit hídrico. Os eventos apresentaram uma produção de biomassa pelo menos 40% maior que as plantas não transformadas ao final de 12 dias de estresse. Também trabalhando com a superprodução de prolina, Balestro et al. (2017) e Li et al. (2017) transformaram cana-de-açúcar variedades RB855536 e Guitang 21 com gene *P5CS* de *V. aconitifolia* e de cana-de-açúcar, respectivamente. Balestro et al. (2017) evidenciaram que as plantas transgênicas acumularam alto teor de açúcar solúvel e Li et al. (2017) que os eventos tiveram maior

teor relativo de água, clorofila, ácido abscísico (ABA) e prolina, além de um menor teor de conteúdo de malondialdeído (MDA) quando comparados às plantas controle.

Além da escolha do gene de interesse para transformação genética, é importante escolher qual a técnica será utilizada para realizar a introdução do gene na cultura alvo. A biobalística tem sido empregada com êxito para a cana-de-açúcar. Por ser um método físico, não apresenta dificuldades em relação a incompatibilidade de genótipos. Porém, pode apresentar baixa eficiência e a integração aleatória de múltiplas cópias do gene, resultando em composições irregulares e o silenciamento gênico (FERREIRA et al., 2017; KRISHNAN; MOHAN, 2017; ISMAGUL et al., 2018).

Assim, o objetivo deste trabalho foi transformar a variedade de cana-de-açúcar RB036088 por meio da biobalística para a tolerância ao estresse hídrico com o uso do gene *P5CS* de *Vigna aconitifolia* sob controle do promotor estresse induzido AIPC.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Micropropagação de Plantas e Transformação Genética (CQB 114/99) do Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade do Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.

4.2.1. Material vegetal e condições gerais de cultura

Segmentos meristemáticos de folhas imaturas (palmitos) de cana-de-açúcar, variedade RB036088, de aproximadamente 8 meses de idade, foram coletados na unidade da RIDESA em Paranavaí, PR, Brasil. Em câmara de fluxo laminar eles foram desinfestados em álcool (70%) por 5 minutos e hipoclorito de sódio (2%) por 25 minutos, seguido de tríplice lavagem com água deionizada autoclavada. As pontas dos palmitos foram descartadas assim como a folha mais externa de cada um. Cada palmito de aproximadamente 4 cm foi seccionado em discos de 2-3 mm. Os discos foram dispostos em placas de Petri, contendo meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG 1962) vitaminas e compostos orgânicos do mesmo meio, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar e 9 µM ácido diclorofenóxiacético (2,4-D). Após 30 dias no escuro, os calos formados foram isolados e transferidos para uma nova placa de petri contendo o mesmo meio de cultura, foram realizados 3 a 5 subcultivos

em intervalos de 15 dias, as placas foram mantidas no escuro. Os calos que apresentaram características embriogênicas foram utilizados no bombardeamento. A metodologia utilizada para indução de embriões somáticos é proveniente dos melhores resultados do capítulo anterior.

4.2.2. Plasmídeo pJ107

O vetor utilizado para a transformação genética, plasmídeo pJS107 (MOLINARI et al., 2007), contém o gene *P5CS* de *Vigna aconitifolia*, sob controle do complexo promotor estresse induzido AIPC. O promotor AIPC contém um elemento ABA responsivo (ABRC1) de 49 pb do gene *HVA22* de cevada (SHEN & HO, 1995), uma versão mínima de 180 pb da região promotora do gene Actina 1 (pAct1-100) de arroz e a sequência intron de 233 pb do gene *HVA22*. O gene marcador de seleção presente no plasmídeo é o *bar*, conferindo resistência ao herbicida glufosinato de amônio, sob o controle do promotor constitutivo CaMV 35S (FIGURA 8).

FIGURA 8 – DIAGRAMA DO PLASMÍDEO pJS107 UTILIZADO NOS EXPERIMENTOS DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE CANA-DE-AÇÚCAR.



Fonte: MOLINARI et al. (2007).

4.2.3. Transformação genética

Para a transformação, calos embriogênicos foram mantidos, por 4 horas antes do bombardeamento, em meio de cultura MS sais e vitaminas, acrescido de 50 mg L⁻¹ de arginina, 50 mg L⁻¹ de cisteína, 0,15 mg L⁻¹ de ácido cítrico, 500 mg L⁻¹ de caseína hidrolisada, 3 mg L⁻¹ de 2,4-D, 20 mg L⁻¹ de sacarose, 0,2 M de sorbitol e 0,2 M de manitol.

A suspensão de micropartículas foi preparada de acordo com a metodologia de Sanford et al. (1993), sendo utilizado 85 µL de suspensão de partículas de tungstênio (85 mg mL⁻¹), 12,1 µL do plasmídeo pJS107 (1 µg µL⁻¹), 121 µL CaCl₂ (2,5 M) e 48,5 µL de espermidina (0,1 M). Para o bombardeamento, foi utilizado o equipamento PDS-1000/He (Biorad®), com pressão de vácuo de 25" Hg e pressão de

ruptura de 1.200 psi. A cada tiro, uma alíquota de 5 µL da suspensão de micropartículas foi depositada na membrana carreadora, que se manteve a uma distância de 12 cm dos explantes.

Após o bombardeamento, os calos foram transferidos para o meio de cultura MS sais e vitaminas, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 6 g L⁻¹ de ágar para a regeneração. As plantas regeneradas foram transferidas para o meio de seleção contendo 20 µM de glufosinato de amônio. As plantas selecionadas foram multiplicadas em meio MS com adição de 0,1 mg L⁻¹ de cinetina (KIN) e 0,2 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP).

As culturas foram mantidas a 27±1 °C sob fotoperíodo de 16 horas luz e intensidade luminosa de 30 µmol m⁻²s⁻¹.

A taxa de eficiência da transformação utilizando as plantas selecionadas em meio seletivo (ET_(EMS)) foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$ET_{(EMS)} = \frac{\text{Número de plantas selecionadas em meio seletivo}}{\text{Número de calos bombardeados}} \times 100$$

4.2.4. Análise de integração do transgene

A análise de integração do transgene foi realizada por reação de cadeia de polimerase (PCR) para detectar a presença do gene *bar* nas plântulas selecionadas em meio seletivo, conforme descrito por Molinari et al. (2007). O gene *bar* foi escolhido para ser utilizado nesta etapa para evitar falso positivo, pois o *P5CS* já é um gene presente no genoma da cana-de-açúcar.

Para a reação de PCR foram utilizados os iniciadores 5'-GTCTGCACCATCGTCAACC-3' e 5'-GAAGTCCAGCTGCCAGAAAC-3' para a amplificação de um fragmento de 450 pb. As reações foram submetidas ao seguinte protocolo: 5 min a 94 °C, seguido de 40 ciclos de amplificação (1 min a 94 °C; 1 min 59 °C; 1 min a 72 °C) e extensão final de 5 min a 72 °C. As análises foram realizadas pela empresa GoGenetic®.

4.2.5. Análise da expressão do transgene

Os eventos confirmados pela PCR foram utilizados para a quantificação relativa da expressão do gene *bar* realizada por qPCR. O RNA de amostras das plântulas *in vitro*, cultivadas em meio de cultura MS, foram extraídas para posterior síntese de

cDNA. A PCR em tempo real foi realizada com SYBR green e com os iniciadores 5'-GTCTGCACCATCGTCAACC-3' e 5'-GAAGTCCAGCTGCCAGAAAC-3' com um tamanho de produto de 450 pb. O gene de referência utilizado foi o gene constitutivo da cana-de-açúcar EF-1 α (EF581011.1), sendo amplificado pelos primers: 5'-TTTCACACTTGGAGTGAAGCAGAT-3' e 5'-GACTTCCTTCACAATCTCATCATAA-3'. Todas as reações foram realizadas em triplicata utilizando o seguinte programa: 2 min a 50 °C e 10 min a 95 °C seguido por 40 ciclos a 94 °C por 15 s e a 60 °C por 60 s (LING et al., 2014). Para cada evento transgênico, o nível relativo de expressão do gene *bar* foi calculado pela fórmula $2^{-2\Delta\Delta CT}$ (limite do ciclo) com base nas curvas padrão e normalização do gene de referência EF (Livak; Schmittgen, 2001). As análises foram realizadas pela empresa GoGenetic®.

4.2.6. Quantificação de prolina

Para determinação dos teores de prolina os eventos foram mantidos, por 15 dias, em meio de cultura MS sais e vitaminas, suplementado com sacarose (30 g L⁻¹) e manitol (0,36 M) para dar o potencial hídrico final de -0,9 MPa. Foram realizados dois tratamentos, 0 e -0,9 MPa devido a quantidade de material disponível para a avaliação (PARMAR; MOORE, 1968). Os tratamentos de cada evento e do controle negativo eram compostos por 2 potes com 3 explantes cada. O controle negativo utilizado nesta etapa foi um dos escapes verificados na PCR, ou seja, um putativo que não apresentou o gene *bar* na PCR. A escolha do potencial osmótico de -0,9 MPa foi baseado nos trabalhos de Cha-um e Kirdmanee (2009) e Oliveira et al. (2018).

Os teores de prolina foram determinados utilizando a metodologia descrita por Bates (1973). Para isso, 200 mg de tecidos foliares foram macerados com 5 mL de ácido sulfosalicílico 3% e centrifugado a 10.000 rpm durante 5 minutos. Coletou-se 1 mL do centrifugado e adicionou-se 2 mL de solução ácida de ninhidrina (1,25 g de ninhidrina, 30 mL de ácido acético glacial, 20 mL de ácido fosfórico 6 M) e 2 mL de ácido acético glacial, em tubos de ensaio. As amostras foram incubadas a 100 °C por 60 minutos e em seguida resfriadas para concluir a reação. Adicionou-se então, 4 mL de tolueno seguido de agitação em vortex por 15 a 20 segundos. O sobrenadante foi utilizado para determinação da concentração de prolina por espectrofotometria (520 nm). As absorbâncias foram comparadas à curva-padrão de L-prolina (0 a 100 μ g mL⁻¹).

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Transformação Genética

A eficiência obtida na transformação considerando as plantas selecionadas em meio seletivo ($ET_{(EMS)}$) contendo glufosinato de amônio da variedade RB036088 com o plasmídeo pJS107 pelo método de biobalística foi de 3%. Foram utilizados 1.230 calos embriogênicos no processo de transformação, destes, 37 sobreviveram ao cultivo em meio seletivo. Dos 37 materiais, 10 foram escolhidos aleatoriamente para os testes de integração do transgene.

A eficiência da transformação (ET) da biobalística pode ser influenciada por diferentes fatores, como, o tipo e tamanho das micropartículas utilizadas como carreadoras do DNA. Utilizar os microcarreadores no tamanho apropriado para a célula alvo irá reduzir os danos e facilitará a recuperação do material. Além do tamanho das micropartículas, o material e a uniformidade interferem, partículas com formatos irregulares tendem a facilitar a formação de agregados, o que prejudica a ET. Microcarreadores biologicamente inertes e atóxicos evitam a acidificação do DNA e de alguns tipos de células (LACORTE et al., 1999; ALTPETER; SANDHU, 2010; OZYIGIT; KURTOGLU, 2020). Matroodi et al. (2013) relataram que a ET de calos de cana-de-açúcar, variedade NCo310, bombardeados com micropartículas de ouro (1 μm de diâmetro) foi 3 vezes superior quando comparado ao uso de micropartículas de tungstênio (1,1 μm de diâmetro). Seguindo a mesma linha, Ramasamy et al. (2018), trabalhando com cana-de-açúcar e cana energia, apontaram que a ET utilizando partículas de ouro (0,3 a 0,6 μm de diâmetro) foi, aproximadamente, 2 vezes maior que a eficiência das micropartículas de tungstênio (1,1 μm de diâmetro).

O tungstênio pode ser tóxico para alguns tipos de células e pode oxidar rapidamente. Porém, está disponível em diversos tamanhos e é fácil de ser revestido com DNA (SANFORD; SMITH; RUSSELL, 1993). Assim, tem sido utilizado para a cana-de-açúcar com eficácia. Zhang et al. (2014) obtiveram 8,5%, 4,66%, 2,35% e 2,81% de $ET_{(EMS)}$ para cana-de-açúcar, variedade FN 95-1702, transformada com os genes *pUBI-PMI*, *pUBI-BAR*, *pUBI-NPTII*, *pUBI-HPT*, respectivamente. Resultados próximos ao encontrado neste trabalho (3%). Já, Yao et al. (2017) trabalhando com a variedade Badila de cana-de-açúcar e com o gene *SCMV-CP*, atingiram 0,07% de $ET_{(EMS)}$.

Outro ponto importante para a ET, é a quantidade de DNA utilizado no preparo da suspensão de micropartículas. O uso de $1 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ de DNA no preparo da suspensão, como foi utilizado no presente trabalho, é comumente aplicado por diferentes autores e para diferentes tipos de microcarreadores (MOLINARI et al., 2007; ZHANG et al., 2014; MALHOTRA et al., 2016; BALESTRO et al., 2017; MBAMBALALA; PANDA; VYVER, 2020). Porém, Khan et al. (2021), trabalhando com transformação de cana-de-açúcar, variedade CP-77/400, com o gene *Osc₃H₂₂* e micropartículas de ouro, observaram que há diferença na ET em função da concentração de DNA. A concentração de $8,5 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ foi a mais eficiente para ET (28%) quando comparada com as concentrações de $2,8 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ e $5,6 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$. Segundo Sanford, Smith e Russell (1993), o aumento na concentração de DNA da suspensão pode elevar a ET, porém esta regra é válida para DNA com elevado grau de pureza. Aparentemente, quando há contaminação por proteínas, ocorre aglomeração das partículas durante o revestimento, reduzindo a ET.

Os parâmetros físicos, como pressão, vácuo, distância entre o tecido alvo e o macrocarreador, são fatores críticos para a ET. A pressão do gás hélio é a força aceleradora das micropartículas e juntamente com a distância percorrida por elas até tecido alvo é que irão determinar a taxa penetração dos microcarreadores no explante (ANUNANTHINI; KUMAR; SATHISHKUMAR, 2017; OZYIGIT; KURTOGLU, 2020). O ajuste da distância entre o macrocarreador e o explante são fundamentais para a ET. Trabalhando com cana-de-açúcar, variedade NCo310, Matroodi et al. (2013) avaliaram as distâncias de 6, 9 e 12 cm entre o macrocarreador e o tecido alvo. A distância de 9 cm foi a que apresentou o maior número de microcarreadores significativos no explante. Zhang et al. (2014), utilizando cana-de-açúcar, variedade FN95-1702, padronizaram a distância de 6 cm, o disco de ruptura de 1.100 psi e obtiveram $ET_{(EMS)}$ máxima de 8,5% e mínima de 2,35% para os genes *pUBI-PMI* e *pUBI-NPTII* respectivamente. Utilizando a mesma metodologia, distância de 6 cm e o disco de ruptura de 1.100 psi, Yao et al. (2017) obtiveram $ET_{(EMS)}$ de 0,07% para a variedade Badila de cana-de-açúcar e gene *SCMV-CP*. Para o presente trabalho, foi utilizado disco de ruptura 1.200 psi e uma distância de 12 cm, com o objetivo de ter maior dispersão das micropartículas, reduzir os danos nas células causados pela alta velocidade e alta pressão dos microcarreadores e diminuir as chances da integração de mais de uma cópia do gene.

Os fatores que afetam a velocidade e a taxa de penetração das micropartículas no material vegetal interagem entre si. Pressões acima de 1.000 psi podem gerar um alto impacto no explante, que pode ser compensado com o aumento da distância entre o macrocarreador e o tecido alvo. A redução nessa distância, pode ser necessária quando a pressão de vácuo é reduzida ou as micropartículas são muito pequenas (0,1 a 0,3 μm). (SANFORD; SMITH; RUSSEL, 1995; ALTPETER; SANDHU, 2010; ANUNANTHINI; KUMAR; SATHISHKUMAR, 2017). Além dessas interações, a cana-de-açúcar, por apresentar um genoma complexo, tem variações de ET a depender da variedade e tipo de explante utilizado (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011; FERREIRA et al, 2017).

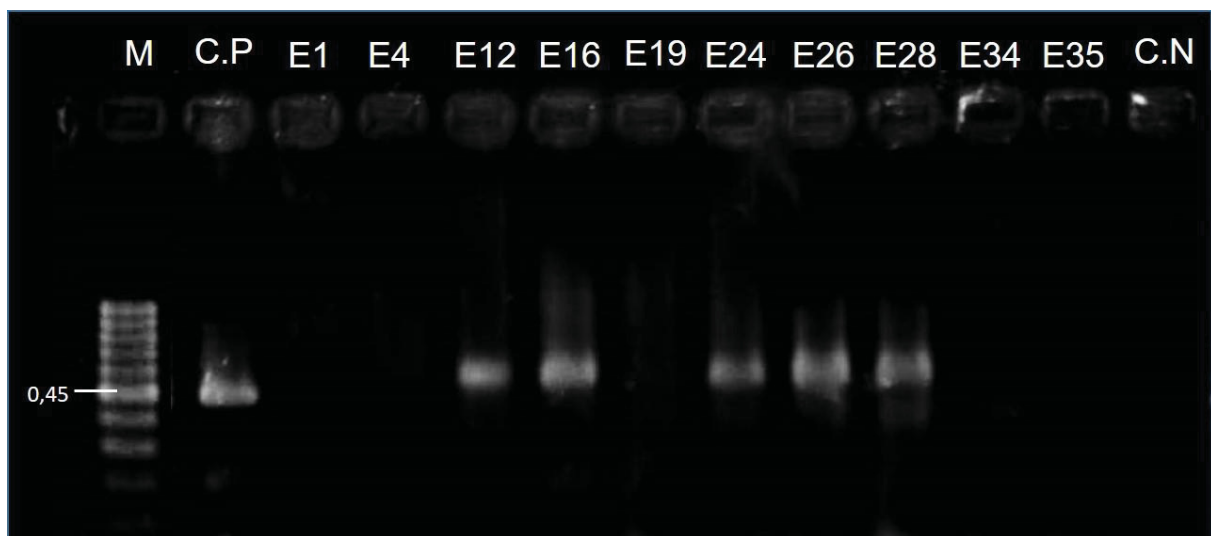
Normalmente os alvos utilizados para a transformação são células saudáveis que podem suportar as tensões do processo de bombardeamento. A embriogênese somática é largamente empregada na biobalística de cana-de-açúcar (BOWER; BIRCH, 1992; MOLINARI et al., 2007; MALHOTRA et al., 2016; RAMIRO et al., 2016; KHAN et al., 2020; MBAMBALALA; PANDA; VYVER, 2020). Os embriões somáticos são preferencialmente escolhidos, pois, estão em constante divisão, o que potencializa a integração do DNA exógeno, e possuem boa capacidade de regeneração (ALTPETER; SANDHU, 2010).

Para reduzir os danos causados pelo bombardeamento, é comum que o material alvo passe por um tratamento osmótico para melhorar a penetração das micropartículas e protegê-lo do rompimento e vazamento celular, diminuindo a pressão de turgor (SANFORD, SMITH; RUSSEL, 1995; CHAKRABORTY et al., 2020). Em cana-de-açúcar, Matroodi et al. (2013), testaram meios de cultura com manitol, sorbitol e manitol + sorbitol para o pré tratamento de calos embriogênicos da variedade NCo310. Foi constatado que o uso de 0,2 M sorbitol + 0,2 M manitol durante quatro horas antes do bombardeamento foi duas vezes mais eficiente que o meio com apenas manitol (0,4 M) ou apenas sorbitol (0,4 M). Outros autores como, Ramasamy et al. (2018), Mbambalala et al. (2020) e Khan et al. (2020) também submetem os calos embriogênicos ao meio osmótico com manitol e sorbitol antes do bombardeamento. Da mesma forma, no presente trabalho os calos foram mantidos em meio osmótico, durante 4 horas, antes do início do processo.

4.3.2. Integração do Transgene

As plantas regeneradas em meio de cultura contendo 20 μ M de glufosinato de amônio somaram 37 putativos, desses, 10 foram escolhidos aleatoriamente para análise de confirmação da inserção do gene *P5CS*. Avaliados por PCR, dos 10 eventos, 5 apresentaram PCR positivo para o gene *bar*. Os eventos positivos por PCR são: E12, E16, E24, E26, e 28 (FIGURA 9).

FIGURA 9 - ANÁLISES DE PCR DE CANA-DE-AÇÚCAR VARIEDADE RB036088 PARA O GENE *bar* (450 pb). LINHA M -MARCADOR MOLECULAR; LINHAS E12, E16, E24, E26, E 28 – PLANTAS TRANSGÊNICAS; LINHAS E1, E4, E19, E34, E35 – ESCAPES; LINHA C.N – CONTROLE NEGATIVO DE CANA-DE-AÇÚCAR VARIEDADE RB036088 (PLANTA NÃO TRANSFORMADA); C.P – CONTROLE POSITIVO (PLASMÍDEO PJS107).



As plantas provenientes dos eventos confirmados foram mantidas e multiplicadas em laboratório para os testes de expressão gênica e análise do teor de prolina.

4.3.3. Análise da expressão do transgene

Amostras dos eventos positivos para PCR, E12, E16, E24, E26, E28 e o controle negativo, foram avaliadas quanto a expressão relativa do gene *bar* comparado a expressão do gene constitutivo *EF-1 α* . O gene referência *EF-1 α* foi escolhido devido a sua boa estabilidade já apresentada em trabalhos anteriores com cana-de-açúcar (LING et al., 2014, SOUZA et al. 2019). Neste estudo não foi diferente, ele foi estável para todas as amostras testadas, com Ct (ciclo do *threshold*) variando de 16 a 18 ciclos e a temperatura de *melting* (*Tm*) demonstrou um padrão específico com pico de $\pm 83,2^{\circ}\text{C}$ em todas as amostras de cDNA. Porém, os resultados dos

eventos não exibiram sinal de expressão para o gene *bar*. Eles apresentaram Ct variando de 31 a 33 ciclos com Tm variando de 71 a 85°C.

Podem ser levantadas duas principais hipóteses para a não detecção do gene *bar* nas plantas PCR positivas para esse gene. A primeira hipótese está ligada ao fenômeno de silenciamento gênico, podendo se dar pela metilação do DNA, modificação das histonas e conseqüentemente remodelação da cromatina. A segunda, ao primer utilizado que pode ter baixa eficiência para detecção do gene alvo por qPCR, o que exigiria um redesenho do primer (BANDOPADHYAY et al., 2010; RUIJTER et al., 2021).

Os valores de Ct elevados podem caracterizar, em casos de silenciamento, gene alvo não detectado ou a detecção de dímeros de primer. A formação desses dímeros se dá pelos resquícios da reação ou pela baixa eficiência do primer, que quando ocorre, também resulta em valores de Ct elevados (MORGANTE; BLAWID, 2016; RUIJTER et al., 2021). A Tm variada pode sinalizar anormalidades na curva de dissociação, que pode ser causada pela baixa especificidade do primer. Valores de Ct baixos, entre 18 e 25, eleva a especificidade da reação e reduz a formação de dímeros (RUIZ-VILLALBA; RUIJTER; van den HOFF, 2021). O uso de amplicon com 80 a 120 pares de bases (pb) aumenta a eficiência da técnica, quanto menor o amplicon maior a eficiência (MORGANTE; BLAWID, 2016). O primer utilizado para qPCR neste trabalho possui 450pb, assim se faz necessário o redesenho do primer para melhor conclusão desta etapa

O uso da PCR para avaliar a presença ou ausência do gene de interesse é uma ferramenta importante para a avaliação dos eventos. Porém, a integração do transgene por si só não garante sua expressão. Para que o gene seja expresso diferentes fatores são decisivos, como o número de cópias do transgene inseridas no DNA vegetal.

O número de cópias do transgene pode influenciar no nível de expressão e estabilidade genética na planta. Durante o processo de transferência do gene alvo para o DNA vegetal é possível que ocorra a integração de mais de uma cópia do transgene. Quando isto ocorre, pode haver redução na taxa de expressão ou silenciamento gênico (BANDOPADHYAY et al., 2010). Em cana-de-açúcar estas variações já foram relatadas. Yao et al. (2017), pesquisando a variedade Badila de cana-de-açúcar transformada com o gene *SCMV-CP*, relataram que os eventos com apenas uma cópia do transgene foram imunes, resistentes e altamente resistentes ao

vírus do mosaico da cana-de-açúcar. Já os eventos que apresentaram duas ou três cópias, foram suscetíveis ou moderadamente resistentes. Por outro lado, Molinari et al. (2007) e Guerzoni et al. (2014) trabalharam com a variedade RB855156 de cana-de-açúcar transformada com o gene *P5CS* e observaram que eventos com uma e duas cópias do transgene não mostraram diferença estatística para o conteúdo de prolina.

Controlar o número de cópias que serão inseridas no DNA não é fácil, visto que a transformação acontece de forma aleatória. A escolha do método e os parâmetros utilizados podem influenciar neste fator. Na biobalística, a velocidade das micropartículas, a disposição do material alvo e a distância entre o macrocarreador e o material biológico são alguns dos parâmetros a serem considerados (ANUNANTHINI; KUMAR; SATHISHKUMAR, 2017). Tradicionalmente o método de transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* tende a integrar apenas uma cópia do gene. Entretanto, WU et al. (2015) trabalhando com cana-de-açúcar, variedade CP88-1762, transformada com o gene *nptII* pelos métodos de biobalística e *A. tumefaciens*, concluíram que não houve diferenças significativas entre os dois métodos para ET, frequência de integração de cópia única e estabilidade da expressão do transgene. Do mesmo modo, Joyce et al. (2014) observaram que a transformação de cana-de-açúcar (variedade Q117) utilizando os dois métodos, produziram eventos de baixo número de cópias do transgene.

A inserção de uma única cópia do transgene é desejável, porém mesmo assim é possível que haja silenciamento dependendo da região de integração no DNA. Esta pode ocorrer em regiões com diferentes níveis de expressão, compactação e tipo de atividade. Acarretando na expressão irregular ou mista. Ademais, é possível que a integração seja de apenas uma parte do cassete. Há, também a possibilidade, de ocorrer um rearranjo espontâneo do DNA durante o processo de transferência, causando danos na expressão do gene (POWLOWSKI; SOMERS, 1996; KOHLI; MIRO; TWYMAN, 2010; BANDOPADHYAY et al., 2010; MOLINARI et al., 2018).

O desenvolvimento de um fenótipo é complexo e requer a atividade em conjunto e coordenada de proteínas e ácidos nucleicos, que determinam se o gene será transcrito, e se transcrito, resultará na produção de uma proteína (BANDOPADHYAY et al., 2010). Esta regulação determina o nível de expressão do gene, que pode ser variável. Rajasekaran et al. (2017) trabalhando com milho, reportaram que entre os eventos transformados com o gene *bar*, houve variação nos

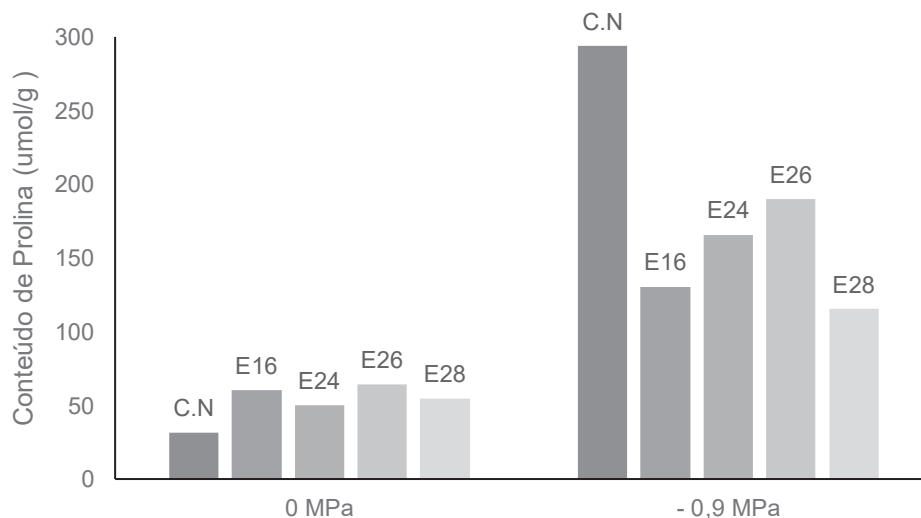
níveis de tolerância ao glufosinato de amônio. Os eventos que não apresentaram nenhum dano nas folhas causado pela aplicação do glufosinato foram os que tiveram os maiores níveis de expressão do gene *bar*, já os eventos que não apresentaram nenhuma expressão tiveram algumas lesões. Mas, mesmo assim, a susceptibilidade do controle negativo foi superior.

A realização de diferentes testes corrobora para o parecer quanto a tolerância ou susceptibilidade de uma planta transformada. Por este motivo, para o presente estudo a quantificação da expressão do gene *P5CS* se faz necessária.

4.3.4. Quantificação da Prolina

Houve diferença para o teor de prolina entre os eventos e os potenciais hídricos (FIGURA 10). O aumento no acúmulo de prolina aconteceu em todos os eventos sob estresse hídrico (-0,9 MPa). Os eventos E16, E24, E26, E28 apresentaram um percentual de incremento de 117%, 233%, 196% e 111%, respectivamente. Porém, o controle negativo apresentou 835% no ganho de prolina em condições de estresse.

FIGURA 10 - TEOR DE PROLINA LIVRE ($\mu\text{MOL/G}$ DE MATÉRIA FRESCA) EM PLANTAS CONTROLE E TRANSGÊNICAS DE CANA-DE-AÇÚCAR VARIEDADE RB036088 SUBMETIDAS A 15 DIAS DE CULTIVO EM MEIO DE CULTURA COM POTENCIAL OSMÓTICO DE 0MPa E -9MPa.



A prolina é um aminoácido com função osmoprotetora e osmorreguladora, ela está intimamente correlacionada com o estresse hídrico. Em situação de estresse o conteúdo de prolina se eleva para contornar os danos causados pelo período crítico (MILNER; McCLELLAN; WOOD, 1987; KAUR; ASTHIR, 2015).

A principal via de síntese da prolina é regulada pela transcrição do gene *P5CS* que codifica a enzima chave pirrolina-5-carboxilase sintase (*P5CS*)

(VERSLUES; SHARMA, 2010). Assim, a superexpressão do gene tem sido demonstrada como uma importante ferramenta para superar períodos de estresse hídrico e salino em diferentes espécies de plantas (MOLINARI et al., 2004; HMIDA-SAYARI et al., 2005; BEHELGDY; MOTAMED; JAZII, 2012; GUERZONI et al., 2014). Em cana-de-açúcar, variedade RB855156, transformada com o gene *P5CS*, Molinari et al. (2007) obtiveram incrementos no teor de prolina dos eventos de até duas vezes e meia a mais que o controle negativo, o que pode ter contribuído no incremento de biomassa das plantas transgênicas frente ao déficit hídrico. Da mesma forma, Li et al. (2018), trabalhando com a superexpressão do gene *SoP5CS* em cana-de-açúcar, variedade GXB 9, relataram eventos com até 50% a mais de prolina e maior tolerância ao estresse quando comparado ao controle negativo.

Diferentemente dos trabalhos relatados, no presente estudo, o controle negativo apresentou até 2,5 vezes mais prolina em condição de estresse hídrico (-0,9 MPa) quando comparado às plantas transformadas. A menor diferença foi de 1,5 vez entre o evento E26 e o controle negativo (FIGURA 10). Além disso, no tratamento de 0 MPa, os eventos chegaram a apresentar até 2 vezes mais prolina (evento E26) do que o controle negativo, mesmo o transgene estando sob controle de um promotor estresse induzido (AIPC).

A correlação entre o conteúdo de prolina e a tolerância ao estresse hídrico nem sempre são positivas. Pospisilova et al. (2011) concluíram que para o tabaco a transformação com o gene *P5CS* (sob controle do promotor 35S) e o incremento de prolina não contribuíram para a tolerância dos eventos ao estresse por altas temperaturas e hídrico. Lima et al. (2019) trabalhando com trigo transformado com o gene *P5CS* (sob controle do promotor AIPC) relataram que, mesmo com incremento no teor de prolina e o efeito osmoprotetor demonstrado nos eventos, não houve diferença na produtividade entre as plantas transformadas e não transformadas.

Ademais, o incremento nos valores de prolina pode ser um indicativo de estresse vegetal e não uma propriedade adaptativa. Existe a hipótese, defendida por alguns autores, de que plantas tolerantes ao estresse apresentem pequenas flutuações neste índice quando são expostas a situações adversas (HARE; CRESS, 1997; RAMPINO et al., 2006). O tema é controverso e autores como, Cia et al. (2012) observaram que variedades de cana-de-açúcar tolerantes ao estresse hídrico (SP90-3414 e SP90-1638) acumularam menor quantidade de prolina, até duas vezes menos, que as variedades sensíveis ao estresse (SP83-2847 e SP835073), após 10 dias de

déficit hídrico. Do mesmo modo, Jain et al. (2014), relataram que a variedade CoLk 94184 apresentou duas vezes mais prolina que a variedade tolerante BO 91 após 72 horas de supressão da irrigação. Oliveira et al. (2018), caracterizaram *in vitro* acessos de cana-de-açúcar quanto a tolerância ao estresse hídrico. Foi observado que *S. officinarum* demonstrou ser a mais tolerante, apesar de ter apresentado o menor conteúdo de prolina, aos 30 dias de cultivo *in vitro* em meio com potencial hídrico de -1,2 Mpa. Santos et al. (2015) e Santos et al. (2019) também observaram que as variedades tolerantes ao estresse hídrico apresentaram pequena flutuação no conteúdo de prolina das plantas em situação de estresse, sugerindo que grandes elevações nas concentrações de prolina são encontradas em variedades sensíveis ao estresse hídrico.

Além disso, Santos et al. (2019) relataram que o conteúdo de prolina pode variar conforme a fase fenológica em que a planta se encontra. Eles observaram que diferentes variedades de cana-de-açúcar, expostas ao estresse hídrico, apresentaram maior incremento do aminoácido durante o perfilhamento, quando comparado ao intenso crescimento e maturação. Hendges et al. (2015), observaram que o conteúdo de prolina em milho apresentou redução quando as plantas foram expostas ao estresse hídrico por 6 dias, os autores sugerem que este resultado possa ser explicado pela fase fenológica em que as plantas se encontravam (V3).

As variações nas respostas ao acúmulo de prolina livre vão depender do seu nível, metabolismo, fase fenológica, espécie de planta e tempo de exposição ao estresse. Sendo assim, o tempo que as plantas do presente trabalho ficaram expostas ao estresse pode não ter sido suficiente para que os eventos atingissem o máximo de prolina. Ademais, é possível que o estágio de desenvolvimento das plantas *in vitro* influencie negativamente no incremento de prolina e que, o potencial osmótico testado não foi suficiente para elevar de forma expressiva o conteúdo de prolina nos eventos. Por isso, é importante que esta análise seja realizada com as plantas aclimatizadas e mais pesquisas sejam realizadas nos eventos utilizados neste trabalho para uma conclusão contundente sobre a tolerância, susceptibilidade ou silenciamento causado pela transformação genética.

4.4. CONCLUSÕES

O protocolo utilizado para a transformação genética da variedade RB036088 é eficiente para obtenção de plantas transgênicas. A introdução do gene *P5CS* de *Vigna aconitifolia* sob controle do promotor estresse induzido AIPC não resultou na biossíntese de prolina superior ao controle negativo em testes preliminares feitos *in vitro* em meio com adição de osmóticos. Mais estudos precisam ser realizados para a conclusão da influência do gene *P5CS* na tolerância ao estresse hídrico da variedade RB036088.

REFERÊNCIAS

- ALTPETER, F.; SANDHU S. Genetic transformation–biolistics. In: DAVEY, M. R.; ANTHONY, P. **Plant Cell Culture: Essential Methods**. 1.Ed. New York:Wiley-Blackwell. p. 217–239. 2010.
- ANUNANTHINI, P.; KUMAR, S. R.; SATHISHKUMAR R. Factors Affecting Genetic Transformation Efficiency in Sugarcane. In: MOHAN, C. **Sugarcane Biotechnology: Challenges and Prospects**. São Carlos. Springer. p. 51-60. 2017.
- BANDOPADHYAY, R.; HAQUE, I.; SINGH, D.; MUKHOPADHYAY, K. Levels and Stability of Expression of Transgenes. In: KOLE, C.; MICHLER, C. H.; ABBOTT, A. G.; HALL, T. C. **Transgenic Crop Plants**. 1. Ed. Springer. 2010. p. 145-186.
- BALESTRO, G. C.; HIGASHI, B.; LOPES, S. M. S.; et al. Biochemical composition of symplastic sap from sugarcane genetically modified to overproduce proline. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 113, p. 133–140, 2017.
- BASU, S.; RAMEGOWDA, V.; KUMAR, A.; PEREIRA, A. Plant adaptation to drought stress. **F1000Research**, v. 5, p. 1–10, 2016.
- BEHELGARDY, M. F.; MOTAMED, N.; JAZII, F. R. Expression of the P5CS gene in transgenic versus nontransgenic olive (*olea europaea*) under salinity stress. **World Applied Sciences Journal**, v. 18, n. 4, p. 580–583, 2012.
- BOWER, R.; BIRCH, R. G. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. **The Plant Journal**, v. 2, n. 3, p. 409–416, 1992.
- CHA-UM, S.; KIRDMANEE, C. Proline Accumulation, Photosynthetic Abilities and Growth Characters of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Plantlets in Response to Iso-Osmotic Salt and Water-Deficit Stress. **Agricultural Sciences in China**, v. 8, n. 1, p. 51–58, 2009.

- CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; DE ABREU, H. M. C.; ARRUDA, P.; et al. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, v. 4, n. 1, p. 62–89, 2011.
- CIA, M. C.; GUIMARÃES, A. C. R.; MEDICI, L. O.; CHABREGAS, S. M.; AZEVEDO, R. A. Antioxidant responses to water deficit by drought-tolerant and -sensitive sugarcane varieties. **Annals of Applied Biology**, v. 161, n. 3, p. 313–324, 2012.
- CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-açúcar 2018/2019. Companhia Nacional de Abastecimento, v. 5, n. 3, p. 70, 2018.
- FERREIRA, T. H. S.; TSUNADA, M. S.; BASSI, D.; et al. Sugarcane water stress tolerance mechanisms and its implications on developing biotechnology solutions. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1–18, 2017.
- GUERZONI, J.T.S., BELINTANI, N.G., MOREIRA, R.M.P. et al. Stress-induced Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) gene confers tolerance to salt stress in transgenic sugarcane. **Acta Physiol Plant**, v. 36, p. 2309–2319, 2014.
- HARE, P. D.; CRESS, W. A. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 21, n. 2, p. 79–102, 1997.
- HENDGES, F. B.; RAMBO, C. R.; ALCASSA, L. P.; et al. Avaliação Enzimática e Fisiológica de Plântulas de Milho Submetidas à Seca. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 4, p. 52–63, 2015.
- HMIDA-SAYARI, A.; GARGOURI-BOUZID, R.; BIDANI, A.; et al. Overexpression of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants. **Plant Science**, v. 169, n. 4, p. 746–752, 2005.
- HUSSAIN, S. S.; KAYANI, M. A.; AMJAD, M. Transcription factors as tools to engineer enhanced drought stress tolerance in plants. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 2, p. 297–306, 2011.
- ISMAGUL, A.; YANG, N.; MALTSEVA, E.; et al. A biolistic method for high-throughput production of transgenic wheat plants with single gene insertions. **BMC Plant Biology**, v. 18, n. 1, p. 1–8, 2018.
- JAIN, R.; CHANDRA, A.; VENUGOPALAN, V. K.; SOLOMON, S. Physiological Changes and Expression of SOD and P5CS Genes in Response to Water Deficit in Sugarcane. **Sugar Tech**, v. 17, n. 3, p. 276–282, 2015.
- JOYCE, P.; HERMANN, S.; O'CONNELL, A.; et al. Field performance of transgenic sugarcane produced using *Agrobacterium* and biolistics methods. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, n. 4, p. 411–424, 2014.
- KAUR, G.; ASTHIR, B. Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. **Biologia Plantarum**, v. 59, n. 4, p. 609–619, 2015.

KHAN, M. S.; AHMAD, W.; AHMAD, M. Z.; ULLAH, M.; JAN, A. Transformation of the OSC3H52 gene promoter in tissue culture of sugarcane. **Journal of Animal and Plant Sciences**, v. 31, n. 1, p. 156–165, 2021.

KIM, Y.; CHUNG, Y. S.; LEE, E.; et al. Root response to drought stress in rice (*Oryza sativa* L.). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 4, p. 12–14, 2020.

KOHLI, A.; MIRO, B.; TWYMAN, R. M. Transgene Integration, Expression and Stability in Plants: Strategies for Improvements. In: KOLE, C.; MICHLER, C. H.; ABBOTT, A. G.; HALL, T. C. **Transgenic Crop Plants**. 1. Ed. Springer. p. 51-60. 2010.

LAJOLO, F. M.; YOKOYAMA, S. M.; CHEAVEGATTI GIANOTTO, A. Sugar derived from genetically modified sugarcane. **Food Science and Technology (Brazil)**, v. 41, n. 1, p. 1–7, 2021.

LAKSHMANAN, PRAKASH, ROBINSON, N. Stress Physiology: Abiotic Stresses. In: P. H. Moore; F. C. Botha (Orgs.); **Sugarcane: Physiology ,Biochemistry and Functional Biology**. 1o ed, p.411–434, 2014.

LI, C.; NONG, Q.; SOLANKI, M. K.; et al. Differential expression profiles and pathways of genes in sugarcane leaf at elongation stage in response to drought stress. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–11, 2016.

LI, J.; PHAN, T. T.; LI, Y. R.; XING, Y. X.; YANG, L. T. Isolation, Transformation and Overexpression of Sugarcane SoP5CS Gene for Drought Tolerance Improvement. **Sugar Tech**, v. 20, n. 4, p. 464–473, 2018.

LIMA, L. A. D. C. DE; SCHUSTER, I.; COSTA, A. C. T. DA. Evaluation of wheat events transformed with the p5cs gene under conditions of water stress. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 42, n. 2, p. 161–170, 2019.

LING, H.; WU, Q.; GUO, J.; XU, L.; QUE, Y. Comprehensive selection of reference genes for gene expression normalization in sugarcane by real time quantitative RT-PCR. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. 1–10, 2014.

MAHMOOD, T.; KHALID, S.; ABDULLAH, M.; et al. Insights into Drought Stress Signaling in Plants and the Molecular Genetic Basis of Cotton Drought Tolerance. **Cells**, v. 9, n. 1, 2019.

MALHOTRA, P. K.; MITTAL, A.; CHOPRA, R.; KAUR, M.; THIND, K. S. Genetic Augmentation of Sugarcane with Stress-Inducible DREB1A Transcription Factor Using Biolistic Approach. **Sugar Tech**, v. 19, n. 5, p. 469–475, 2016.

MATROODI, S.; MOTALLEBI, M.; ZAMANI, M.; et al. Sugarcane (NCo310) Transient Transformation Using uidA Reporter Gene. **Iran J Biotech**, v. 11, n. 2, p. 89–95, 2013.

MBAMBALALA, N.; PANDA, S. K.; VAN DER VYVER, C. Overexpression of AtBBX29 Improves Drought Tolerance by Maintaining Photosynthesis and Enhancing

the Antioxidant and Osmolyte Capacity of Sugarcane Plants. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 39, n. 2, p. 419–433, 2020.

MILNER, J. L.; MCCLELLAN, D. J.; WOOD, J. M. Factors reducing and promoting the effectiveness of proline as an osmoprotectant in *Escherichia coli* K12. **Journal of General Microbiology**, v. 133, n. 7, p. 1851–1860, 1987.

MOLINARI, H. B. C.; MARUR, C. J.; DAROS, E.; et al. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): Osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, v. 130, n. 2, p. 218–229, 2007.

MOLINARI, H. B. C.; MARUR, C. J.; FILHO, J. C. B.; et al. Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. **Plant Science**, v. 167, n. 6, p. 1375–1381, 2004.

MOLINARI, M. D. C.; FUGANTI-PAGLIARINI, R.; BARBOSA, D. A.; et al. Seleção de sementes de soja geneticamente modificadas com o gene marcador bar por meio do teste de germinação em solução de glufosinato de amônio. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 61, p. 1–7, 2018.

MORGANTE, C. V.; BLAWID, R. **Análise da Expressão Gênica pela Técnica de PCR Quantitativa em Tempo Real: Princípios e Fundamentos**. Petrolina. EMBRAPA. p. 30-41. 2016.

MURASHIGE T.; SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.** 15: 473–497; 1962.

OLIVEIRA, L. A. R. DE; CARDOSO, M. N.; OLIVEIRA, A. C. A. DE; et al. Effects of in vitro Drought Stress on Growth, Proline Accumulation and Antioxidant Defense in Sugarcane. **Journal of Agricultural Science**, v. 10, n. 5, p. 135, 2018.

OZYIGIT, I. I.; YUCEBILGILI KURTOGLU, K. Particle bombardment technology and its applications in plants. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 12, p. 9831–9847, 2020.

PARMAR, M. T.; MOORE, R. P. Carbowax 6000, Mannitol, and Sodium Chloride for Simulating Drought Conditions in Germination Studies of Corn (*Zea mays* L.) of Strong and Weak Vigor 1. **Agronomy Journal**, v. 60, n. 2, p. 192–195, 1968.

PAWLOWSKI, W. P.; SOMERS, D. A. Transgene Inheritance in Plants Genetically Engineered by Microprojectile Bombardment. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 17–30, 1996.

POSPISILOVA, J.; HASEL, D.; VANKOVA, R. Responses of Transgenic Tobacco Plants with Increased Proline Content to Drought and/or Heat Stress. **American Journal of Plant Sciences**, v. 2, n. 3, p. 318–324, 2011.

RAJASEKARAN, K.; MAJUMDAR, R.; SICKLER, C.; et al. Fidelity of a simple Liberty leaf-painting assay to validate transgenic maize plants expressing the selectable marker gene, bar. **Journal of Crop Improvement**, v. 31, n. 4, p. 628–636, 2017.

RAMASAMY, M.; MORA, V.; DAMAJ, M. B.; et al. A biolistic-based genetic transformation system applicable to a broad-range of sugarcane and energycane varieties. **GM Crops and Food**, v. 9, n. 4, p. 211–227, 2018.

RAMIRO, D. A.; MELOTTO-PASSARIN, D. M.; BARBOSA, M. DE A.; et al. Expression of Arabidopsis Bax Inhibitor-1 in transgenic sugarcane confers drought tolerance. **Plant Biotechnology Journal**, v. 14, n. 9, p. 1826–1837, 2016.

RAMPINO, P.; PATALEO, S.; GERARDI, C.; MITA, G.; PERROTTA, C. Drought stress response in wheat: Physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. **Plant, Cell and Environment**, v. 29, n. 12, p. 2143–2152, 2006.

RUIJTER, J. M.; BARNEWALL, R. J.; MARSH, I. B.; et al. Efficiency Correction Is Required for Accurate Quantitative PCR Analysis and Reporting. **Clinical chemistry**, v. 67, n. 6, p. 829–842, 2021.

RUIZ-VILLALBA, A.; RUIJTER, J. M.; VAN DEN HOFF, M. J. B. Use and misuse of cq in qpcr data analysis and reporting. **Life**, v. 11, n. 6, p. 1–22, 2021.

SANFORD, J. C.; SMITH, F. D.; RUSSELL, J. A. Optimizing the Biolistic Process for Different Biological Applications. **Academic Press, INC.**, 1995.

SANFORD, J.C.; SMITH, F.D.; RUSSELL, J.A. Optimizing the biolistic process for different biological applications. **Methods in Enzymology**, v.217, p.483-509, 1993.

SANTOS, C. M.; DE ALMEIDA SILVA, M.; LIMA, G. P. P.; et al. Physiological Changes Associated with Antioxidant Enzymes in Response to Sugarcane Tolerance to Water Deficit and Rehydration. **Sugar Tech**, v. 17, n. 3, p. 291–304, 2015.

SANTOS, C. M. DOS; ENDRES, L.; DA SILVA, A. C. S.; et al. Water Relations and Osmolite Accumulation Related to Sugarcane Yield Under Drought Stress in a Tropical Climate. **International Journal of Plant Production**, v. 13, n. 3, p. 227–239, 2019.

SOUZA, W. R.; PACHECO, T. F.; DUARTE, K. E.; et al. Silencing of a BAHD acyltransferase in sugarcane increases biomass digestibility. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 1–14, 2019.

VERSLUES, P. E.; SHARMA, S. Proline Metabolism and Its Implications for Plant-Environment Interaction. **The Arabidopsis Book**, v. 8, p. 1–23, 2010.

WEBBER, H.; EWERT, F.; OLESEN, J. E.; et al. Diverging importance of drought stress for maize and winter wheat in Europe. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2018.

WU, H.; AWAN, F. S.; VILARINHO, A.; et al. Transgene integration complexity and expression stability following biolistic or Agrobacterium-mediated transformation of sugarcane. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 51, n. 6, p. 603–611, 2015.

YAO, W.; RUAN, M.; QIN, L.; et al. Field performance of transgenic sugarcane lines resistant to sugarcane mosaic virus. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1–9, 2017.

ZHANG, M.; ZHUO, X.; WANG, J.; et al. Effective selection and regeneration of transgenic sugarcane plants using positive selection system. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 51, n. 1, p. 52–61, 2014.

ZHANG, X.; LEI, L.; LAI, J.; ZHAO, H.; SONG, W. Effects of drought stress and water recovery on physiological responses and gene expression in maize seedlings. **BMC Plant Biology**, v. 18, n. 1, p. 1–16, 2018.

ZHAO, X.; JIANG, Y.; LIU, Q.; et al. Effects of Drought-Tolerant Ea-DREB2B Transgenic Sugarcane on Bacterial Communities in Soil. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1–11, 2020.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cana-de-açúcar é uma cultura que possui genoma complexo e com grande variabilidade dentro da espécie. Assim, há a necessidade do desenvolvimento de protocolos de cultura de tecidos e transformação genética específicos para cada variedade. Diante disso, neste material constam protocolos eficientes de embriogênese somática para as variedades RB036066, RB036088 e RB036091 e de transformação genética por biobalística para a variedade RB036088. Como sugestão para otimizar o protocolo de embriogênese somática e entender melhor o comportamento *in vitro* das variedades citadas, sugere-se que, sejam avaliadas a indução de calos com outros reguladores, como o TDZ e a combinação de 2,4-D com BAP e KIN. É válido também, avaliar a interação da época do ano em que o palmito foi colhido com a formação e conversão dos calos.

O trabalho aqui desenvolvido é apenas o início dos estudos de transformação genética para a variedade RB036088 e a avaliação da superexpressão de prolina. Mais trabalhos precisam ser desenvolvidos para otimizar o protocolo de transformação genética da variedade e melhor compreensão do material transformado. Na biobalística é importante avaliar a eficiência da transformação com diferentes distancias entre o tecido alvo e o carreador, além de, testar discos de ruptura de menor pressão.

Para endossar a conclusão deste trabalho é necessário avaliar os fatores envolvidos na expressão do transgene, como o número de cópias inseridas nos eventos e a expressão do gene *P5CS* em cada um deles. Já que são parâmetros que influenciam diretamente no fenótipo dos transformados. Além disso, são necessárias as análises de parâmetros biométricos, com as plantas aclimatizadas, como: crescimento das plantas, massa seca e fresca de folhas e raízes em condição de estresse, a fim de avaliar o nível de danos sofridos ou não pelos eventos. Outro ponto relevante é a investigação do estresse oxidativo e das respostas antioxidantes dos transformados aclimatizados sob estresse, como: conteúdo de malondialdeído, H_2O_2 e prolina, estes resultados vão contribuir para compreensão das respostas ao estresse da variedade RB036088 transformada com o gene pJS107. Com resultados positivos para aumento da tolerância ao estresse, é interessante avaliar a estabilidade dos eventos ao longo do tempo.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAMSSON, M.; VALLADARES, S.; LARSSON, E.; CLAPHAM, D.; VON ARNOLD, S. Patterning during somatic embryogenesis in Scots pine in relation to polar auxin transport and programmed cell death. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 109, n. 3, p. 391–400, 2012.
- AGUIAR, N. O.; MEDICI, L. O.; OLIVARES, F. L.; et al. Metabolic profile and antioxidant responses during drought stress recovery in sugarcane treated with humic acids and endophytic diazotrophic bacteria. ***Annals of Applied Biology***, v. 168, n. 2, p. 203–213, 2016.
- AHLOOWALIA, B. S.; MARETZKI, A. Plant regeneration via somatic embryogenesis in sugarcane. ***Plant Cell Reports***, v. 2, p. 21–25, 1983.
- AHMAD, F. I.; JOHAN, N. S.; WAGIRAN, A. Effect of 2,4-D on Embryogenic Callus Induction of Malaysian indica Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars MR123 and MR127. ***Jurnal Teknologi***, v. 64, n. 2, p. 75–78, 2013.
- ALCANTARA, G. B. DE; DIBAX, R.; OLIVEIRA, R. A. DE; BESPALHOK FILHO, J. C.; DAROS, E. Plant regeneration and histological study of the somatic embryogenesis of sugarcane (*Saccharum* spp.) cultivars RB855156 and RB72454. ***Acta Scientiarum***. Agronomy, v. 36, n. 1, p. 63, 2014.
- ALTPETER, F.; SANDHU S. Genetic transformation–biolistics. In: DAVEY, M. R.; ANTHONY, P. ***Plant Cell Culture: Essential Methods***. 1.Ed. New York:Wiley-Blackwell, 2010. p. 217–239.
- AMINI, S.; GHOBADI, C.; YAMCHI, A. Proline accumulation and osmotic stress: an overview of P5CS gene in plants. ***Journal of Plant Molecular Breeding***, v. 3, n. 2, p. 44–55, 2015.
- ANUNANTHINI, P.; KUMAR, S. R.; SATHISHKUMAR R. Factors Affecting Genetic Transformation Efficiency in Sugarcane. In: MOHAN, C. ***Sugarcane Biotechnology: Challenges and Prospects***. São Carlos. Springer. p. 51-60. 2017.
- ANUR, R. M.; MUFITHAH, N.; SAWITRI, W. D.; SAKAKIBARA, H.; SUGIHARTO, B. Overexpression of sucrose phosphate synthase enhanced sucrose content and biomass production in transgenic sugarcane. ***Plants***, v. 9, n. 200, p. 1–11, 2020.
- ARAÚJO, R.; ALVES JUNIOR, J.; CASAROLI, D.; EVANGELISTA, A. W. P. Variação na qualidade da matéria-prima da cana-de-açúcar em decorrência da suspensão da irrigação antes da colheita e da ocorrência de baixas temperaturas. ***Bragantia***, v. 75, n. 1, p. 118–127, 2016.
- ASLAM, U.; TABASSUM, B.; NASIR, I. A.; KHAN, A.; HUSNAIN, T. A virus-derived short hairpin RNA confers resistance against sugarcane mosaic virus in transgenic sugarcane. ***Transgenic Research***, v. 27, n. 2, p. 203–210, 2018.

AUDE, M. I. DA S. Estádios de Desenvolvimento da Cana-de-açúcar e suas Relações com a Produtividade. **Ciência Rural**, v. 23, n. 2, p. 241–248, 1993.

AUGUSTINE, S. M.; ASHWIN NARAYAN, J.; SYAMALADEVI, D. P.; et al. Overexpression of EaDREB2 and pyramiding of EaDREB2 with the pea DNA helicase gene (PDH45) enhance drought and salinity tolerance in sugarcane (*Saccharum spp. hybrid*). **Plant Cell Reports**, v. 34, n. 2, p. 247–263, 2014.

AUGUSTINE, S. M.; NARAYAN, J. A.; SYAMALADEVI, D. P.; et al. *Erianthus arundinaceus* HSP70 (EaHSP70) overexpression increases drought and salinity tolerance in sugarcane (*Saccharum spp. hybrid*). **Plant Science**, v. 232, p. 23–34, 2015.

BALESTRO, G. C.; HIGASHI, B.; LOPES, S. M. S.; et al. Biochemical composition of symplastic sap from sugarcane genetically modified to overproduce proline. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 113, p. 133–140, 2017.

BANDOPADHYAY, R.; HAQUE, I.; SINGH, D.; MUKHOPADHYAY, K. Levels and Stability of Expression of Transgenes. In: KOLE, C.; MICHLER, C. H.; ABBOTT, A. G.; HALL, T. C. **Transgenic Crop Plants**. 1. Ed. Springer. 2010. p. 145-186.

BASNAYAKE, J.; JACKSON, P. A.; INMAN-BAMBER, N. G.; LAKSHMANAN, P. Sugarcane for water-limited environments. Genetic variation in cane yield and sugar content in response to water stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 16, p. 6023–6033, 2012.

BASNAYAKE, S. W. V.; MOYLE, R.; BIRCH, R. G. Embryogenic callus proliferation and regeneration conditions for genetic transformation of diverse sugarcane cultivars. **Plant Cell Reports**, v. 30, n. 3, p. 439–448, 2011.

BASU, S.; RAMEGOWDA, V.; KUMAR, A.; PEREIRA, A. Plant adaptation to drought stress. **F1000Research**, v. 5, p. 1–10, 2016.

BATISTA, E. L. DAS S.; ZOLNIER, S.; RIBEIRO, A.; et al. Avaliação do efeito do estresse hídrico no crescimento de cultivares de cana-de-açúcar usando um sistema automático de fertirrigação. **Engenharia Agrícola**, v. 35, n. 2, p. 215–229, 2015.

BATTIE LACLAU, P.; LACLAU, J. P. Growth of the whole root system for a plant crop of sugarcane under rainfed and irrigated environments in Brazil. **Field Crops Research**, v. 114, n. 3, p. 351–360, 2009.

BEHELGARDY, M. F.; MOTAMED, N.; JAZII, F. R. Expression of the P5CS gene in transgenic versus nontransgenic olive (*olea europaea*) under salinity stress. **World Applied Sciences Journal**, v. 18, n. 4, p. 580–583, 2012.

BELIDE, S.; VANHERCKE, T.; PETRIE, J. R.; SINGH, S. P. Robust genetic transformation of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) using differentiating embryogenic callus induced from immature embryos. **Plant Methods**, v. 13, n. 109, p. 1–12, 2017.

BHASKARA, G. B.; YANG, T. H.; VERSLUES, P. E. Dynamic proline metabolism: Importance and regulation in water limited environments. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1–7, 2015.

BLUM, A. Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production. **Plant Cell and Environment**, v. 40, n. 1, p. 4–10, 2017.

BOWER, R.; BIRCH, R. G. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. **The Plant Journal**, v. 2, n. 3, p. 409–416, 1992.

BOWER, R.; ELLIOTT, A. R.; POTIER, B. A. M.; BIRCH, R. G. High-efficiency, microprojectile-mediated cotransformation of sugarcane, using visible or selectable markers. **Molecular Breeding**, v. 2, n. 3, p. 239–249, 1996.

BRAIBANTE, M. E. F.; PAZINATO, M. S.; ROCHA, T. R. DA; FRIEDRICH, L. DA S.; NARDY, F. C. A Cana-de-Açúcar no Brasil sob um Olhar Químico e Histórico: Uma Abordagem Interdisciplinar. **Química Nova na Escola**, v. 35, n. 1, p. 3–10, 2013.

BRASIL, **Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio**. Extrato de parecer técnico nº 5.483/2017. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. 2017

BRASILEIRO, A. C. M.; ALENCAR, D. M. Transformação Genética de Plantas. In: TORRES, A. C., CALDAS, Linda Styer, BUSO, José Amauri. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. 1. Ed. Brasília: Embrapa. 1999. p. 679-736.

BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. de C. **Manual De Transformação Genética De Plantas**. 2. Ed. Brasília: Embrapa. 2015. p.16-19

BRISIBE, E. A.; NISHIOKA, D.; MIYAKE, H.; TANIGUCHI, T. Developmental electron microscopy and histochemistry of somatic embryo differentiation in sugarcane. **Plant Science**, v. 89, p. 85–92, 1993.

CAI, S.; JIANG, G.; YE, N.; et al. A key ABA catabolic gene, OsABA8ox3, is involved in drought stress resistance in rice. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. 1–13, 2015.

CALVETE, E. O.; KAMPF, A. N.; BERGAMASCHI, H.; DAUDT, R. HENRIQUE S. Avaliação do crescimento de plantas de morangueiro durante a aclimatização ex vitro. **Horticultura brasileira**, v. 18, p. 188–192, 2000.

CAPELLADES, M.; LEMEURE, R.; DEBERGH, P. Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in Rosa cultured in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 25, n. 1, p. 21–26, 1991.

CARVALHO, A. L. DE; SANTOS, D. V.; MARENGO, J. A.; COUTINHO, S. M. V.; MAIA, S. M. F. Impactos da ocorrência de eventos climáticos extremos na produção agrícola brasileira. **Sustentabilidade em Debate**, v. 11, n. 3, p. 197–210, 2020.

CARVALHO, S. A. D.; FURTADO, A. T. O Melhoramento Genético de Cana-de-açúcar no Brasil e o Desafio das Mudanças Climáticas Globais. **Revista Gestão & Conexões**, v. 2, n. 1, p. 22–46, 2013.

CHAKRABORTY, N., CHAKRABORTY, P., SEN, M., BANDOPADHYAY, R. Choice of Explant for Plant Genetic Transformation. In: RUSTGI, H., LUO, H. **Biolistic DNA Delivery in Plants**. Springer Protocols. p. 107-123. 2020.

CHA-UM, S.; KIRDMANEE, C. Proline Accumulation, Photosynthetic Abilities and Growth Characters of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Plantlets in Response to Iso-Osmotic Salt and Water-Deficit Stress. **Agricultural Sciences in China**, v. 8, n. 1, p. 51–58, 2009.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; DE ABREU, H. M. C.; ARRUDA, P.; et al. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, v. 4, n. 1, p. 62–89, 2011.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; GENTILE, A.; OLDEMBURGO, D. A.; et al. Lack of detection of Bt sugarcane Cry1Ab and nptII DNA and proteins in sugarcane processing products including raw sugar. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 6, p. 1–24, 2018.

CIA, M. C.; GUIMARÃES, A. C. R.; MEDICI, L. O.; CHABREGAS, S. M.; AZEVEDO, R. A. Antioxidant responses to water deficit by drought-tolerant and -sensitive sugarcane varieties. **Annals of Applied Biology**, v. 161, n. 3, p. 313–324, 2012.

COMEXSTAT. Exportação e Importação Geral. Disponível em: <http://comexstat.mdic.gov.br/pt/geral/19040>. Acesso em 11.set.2020

CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-açúcar 2018/2019**. Companhia Nacional de Abastecimento, v. 5, n. 3, p. 70, 2018.

CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-açúcar 2019/2020**. Companhia Nacional de Abastecimento, v. 6, n. 4, p. 62, 2020b.

CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-açúcar 2020/21**. Companhia Nacional de Abastecimento, v. 7, n. 2, p. 64, 2020a.

CTC. Variedades CTC. Disponível em: <https://ctc.com.br/produtos/>. Acesso em: 15 nov. 2021.

D'HONT, A.; GRIVET, L.; FELDMANN, P.; et al. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. **Molecular And General Genetics**, v. 250, p. 405–413, 1996.

DAL-BIANCO, M.; CARNEIRO, M. S.; HOTTA, C. T.; et al. Sugarcane improvement: How far can we go? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 265–270, 2012.

DAR, M.I., NAIKOO, M.I., REHMAN, F., NAUSHIN, F., KHAN, F.A. Proline Accumulation in Plants: Roles in Stress Tolerance and Plant Development. In: Iqbal, N., Nazar, R., A. Khan, N. (eds) **Osmolytes and Plants Acclimation to Changing Environment: Emerging Omics Technologies**. Springer, New Delhi. p.155–163, 2015.

- DAS, K.; ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in Environmental Science**, v. 2, p. 1–13, 2014.
- DE FREITAS, P.A.F.; DE SOUZA, M. R.; MARQUES, E.C. et al. Salt Tolerance Induced by Exogenous Proline in Maize Is Related to Low Oxidative Damage and Favorable Ionic Homeostasis. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 37, p. 911–924, 2018.
- DE LA TORRE, C. M.; FINER, J. J. The intron and 5' distal region of the soybean Gmubi promoter contribute to very high levels of gene expression in transiently and stably transformed tissues. **Plant Cell Reports**, v. 34, n. 1, p. 111–120, 2015.
- DEWANTI, P., WIDURI, L. I., AINIYATI, C.; et al. Elimination of SCMV (Sugarcane Mozaik Virus) and Rapid Propagation of Virus-free Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Using Somatic Embryogenesis. **Procedia Chemistry**, v. 18, p. 96–102, 2016.
- DINH, T. H.; WATANABE, K.; TAKARAGAWA, H.; NAKABARU, M.; KAWAMITSU, Y. Photosynthetic response and nitrogen use efficiency of sugarcane under drought stress conditions with different nitrogen application levels. **Plant Production Science**, v. 20, n. 4, p. 412–422, 2017.
- DOORENBOS, J.; KASSAN, A. H. Yield response to water. Rome: FAO, p. 193. FAO, **Irrigation and Drainage Paper**, 33. 1979.
- DUARTE, F. E. V. DE O.; BARROS, D. DOS R.; GIRARDI, E. A.; SOARES FILHO, W. DOS S.; PASSOS, O. S. Poliembriõnia e atributos morfológicos de sementes de porta-enxertos de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 1, p. 246–254, 2012.
- FAOSTAT. Production - Crops and livestock products. Disponível em: https://www.fao.org/faostat/en/#data/domains_table. Acesso em 14 nov. 21.
- FEHÉR, A. Somatic embryogenesis - stress-induced remodeling of plant cell fate. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1849, n. 4, p. 385–402, 2015.
- FEHÉR, A. Why somatic plant cells start to form embryos? **Plant Cell Monographs**, v. 2, p. 85–101, 2005.
- FEHÉR, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, n. 3, p. 201–228, 2003.
- FERREIRA, L. T.; SILVA, M. M. DE A.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R.; WILLADINO, L. Using LED lighting in somatic embryogenesis and micropropagation of an elite sugarcane variety and its effect on redox metabolism during acclimatization. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 128, n. 3, p. 211–221, 2017.

FERREIRA, T. H. S.; TSUNADA, M. S.; BASSI, D.; et al. Sugarcane water stress tolerance mechanisms and its implications on developing biotechnology solutions. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1–18, 2017.

FILONOVA, L. H.; BOZHKO, P. V.; BRUKHIN, V. LADIMIR B.; et al. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. **Journal of Cell Science**, v. 113, n. 24, p. 4399–4411, 2000.

FLOH, E. I. S.; SANTOS, A. L. W.; DEMARCO, D. Embriogênese vegetal: abordagens básicas e biotecnológicas. **Biociência Aplicada à Saúde**. p.87–111, 2015.

GALLO-MEAGHER, M.; ENGLISH, R. G.; ABOUZID, A. Thidiazuron stimulates shoot regeneration of sugarcane embryogenic callus. **In Vitro Cell. Dev. Biol.**, v. 36, p. 37–40, 2000.

GRATTAPAGLIA, D. M., MACHADO, A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa – CNPH. 1998. p. 183-260.

GRIMI, D. A.; PARODY, B.; RAMOS, M. L.; et al. Field-evolved resistance to Bt maize in sugarcane borer (*Diatraea saccharalis*) in Argentina. **Pest Management Science**, v. 74, n. 4, p. 905–913, 2018.

GUERRA, M. P., TORRES, A. C., TEIXEIRA, J. B. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. 1. Ed. Brasília: Embrapa. 1999. p 533-568

GUERZONI, J.T.S., BELINTANI, N.G., MOREIRA, R.M.P. et al. Stress-induced Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) gene confers tolerance to salt stress in transgenic sugarcane. **Acta Physiol Plant**, v. 36, p. 2309–2319, 2014.

GUPTA, P. K.; DURZAN, D. J. Somatic embryos from protoplasts of loblolly pine proembryonal cells. **Bio/Technology**, v. 5, n. 7, p. 710–712, 1987.

HANIF, S., SALEEM, M.F., SARWAR, M. et al. Biochemically Triggered Heat and Drought Stress Tolerance in Rice by Proline Application. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 40, p.305–312, 2021.

HARE, P. D.; CRESS, W. A. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 21, n. 2, p. 79–102, 1997.

HAYAT, S.; HAYAT, Q.; ALYEMENI, M. N.; et al. Role of proline under changing environments: A review. **Plant Signaling and Behavior**, v. 7, n. 11, p. 1456–1466, 2012.

HE, D. G.; TANNER, G.; SCOTT, K. J. Somatic embryogenesis and morphogenesis in callus derived from the epiblast of immature embryos of wheat (*Triticum aestivum*). **Plant Science**, v. 45, n. 2, p. 119–124, 1986.

HEINZ, D. J.; MEE, G. W. P. Plant Differentiation from Callus Tissue of *Saccharum* Species. **Crop Science**, v. 9, p. 3–5, 1969.

HENDGES, F. B.; RAMBO, C. R.; ALCASSA, L. P.; et al. Avaliação Enzimática e Fisiológica de Plântulas de Milho Submetidas à Seca. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 4, p. 52–63, 2015.

HERINGER, A. S.; BARROSO, T.; MACEDO, A. F.; et al. Label-Free Quantitative Proteomics of Embryogenic and Non-Embryogenic Callus during Sugarcane Somatic Embryogenesis. **Plos One**, v. 10, n. 6, p. 1–23, 2015.

HERVÉ, E., ROMAIN, G., THIERRY, B., JEAN-CHRISTOPHE, B., ESTELLE, J. Plant Fidelity in Somatic Embryogenesis-Regenerated Plants. In: LOYOLA-VARGAS, V.M, OCHOA-ALEJO, N. **Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications**. Springer. p. 121-150. 2016.

HIMMELBACH, A.; YANG, Y.; GRILL, E. Relay and control of abscisic acid signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, n. 5, p. 470–479, 2003.

HMIDA-SAYARI, A.; GARGOURI-BOUZID, R.; BIDANI, A.; et al. Overexpression of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants. **Plant Science**, v. 169, n. 4, p. 746–752, 2005.

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**, v. 118, n. 3, p. 169–180, 1983.

HONG, Z.; LAKKINENI, K.; ZHANG, Z.; VERMA, D. P. S. Removal of feedback inhibition of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. **Plant Physiology**, v. 122, n. 4, p. 1129–1136, 2000.

HOQUE, M. A.; BANU, M. N. A.; OKUMA, E.; et al. Exogenous proline and glycinebetaine increase NaCl-induced ascorbate-glutathione cycle enzyme activities, and proline improves salt tolerance more than glycinebetaine in tobacco Bright Yellow-2 suspension-cultured cells. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, n. 11, p. 1457–1468, 2007.

HOSSAIN, M. A.; BHATTACHARJEE, S.; ARMIN, S. M.; et al. Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: Insights from ROS detoxification and scavenging. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1–19, 2015.

HOTTA, C. T.; LEMBKE, C. G.; DOMINGUES, D. S.; et al. The biotechnology roadmap for sugarcane improvement. **Tropical Plant Biology**, v. 3, n. 2, p. 75–87, 2010.

HSIAO, T.C. Plant response to water stress. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.4, p.519-70, 1973.

HUSSAIN, S. S.; KAYANI, M. A.; AMJAD, M. Transcription factors as tools to engineer enhanced drought stress tolerance in plants. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 2, p. 297–306, 2011.

IGARASHI, Y.; YOSHIBA, Y.; SANADA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; WADA, K. SHINOZAKI, K. Characterization of the gene for Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and correlation between the expression of the gene and salt tolerance in *Oryza sativa* L. **Plant Molecular Biology**, v. 33, p. 857–865, 1997.

INMAN-BAMBER, N. G.; LAKSHMANAN, P.; PARK, S. Sugarcane for water-limited environments: Theoretical assessment of suitable traits. **Field Crops Research**, v. 134, p. 95–104, 2012.

INMAN-BAMBER, N. G.; SMITH, D. M. Water relations in sugarcane and response to water deficits. **Field Crops Research**, v. 92, p. 185–202, 2005.

IPCC. Global warming of 1.5 °C. *Ipcc - Sr15*, v. 2, n. October, p. 17–20, 2018. Disponível em: www.environmentalgraphiti.org.

ISAAA. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2019: Biotech Crops Drive SocioEconomic Development and Sustainable Environment in the New Frontier. **ISAAA** Brief No. 55. ISAAA: Ithaca, NY. 2019.

ISMAGUL, A.; YANG, N.; MALTSEVA, E.; et al. A biolistic method for high-throughput production of transgenic wheat plants with single gene insertions. **BMC Plant Biology**, v. 18, n. 1, p. 1–8, 2018.

JAIN, R.; CHANDRA, A.; VENUGOPALAN, V. K.; SOLOMON, S. Physiological Changes and Expression of SOD and P5CS Genes in Response to Water Deficit in Sugarcane. **Sugar Tech**, v. 17, n. 3, p. 276–282, 2015.

JOYCE, P.; HERMANN, S.; O'CONNELL, A.; et al. Field performance of transgenic sugarcane produced using *Agrobacterium* and biolistics methods. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, n. 4, p. 411–424, 2014.

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 Reports**, v. 29, n. 2, p. 173–183, 2010.

JÚNIOR, S. DE O. M.; DE ANDRADE, J. R.; DOS SANTOS, C. M.; et al. Osmoregulators' accumulation minimizes the effects of drought stress in sugarcane and contributes to the recovery of photochemical efficiency in photosystem II after rewatering. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 42, n. 4, p. 1–11, 2020.

KARAMI, O.; SAIDI, A. The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. **Molecular Biology Reports**, v. 37, n. 5, p. 2493–2507, 2010.

KAUR, G.; ASTHIR, B. Impact of exogenously applied ABA on proline metabolism conferring drought and salinity stress tolerance in wheat genotypes. **Cereal Research Communications**, v. 48, n. 3, p. 309–315, 2020.

KAUR, G.; ASTHIR, B. Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. **Biologia Plantarum**, v. 59, p. 609–619, 2015.

KAUR, R.; KAPOOR, M. Plant Regeneration Through Somatic Embryogenesis in Sugarcane. **Sugar Tech**, v. 18, n. 1, p. 93–99, 2016.

KEATING, B. A.; ROBERTSON, M. J.; MUCHOW, R. C.; HUTH, N. I. Modelling sugarcane production systems I. Development and performance of the sugarcane module. **Field Crops Research**, v. 61, n. 3, p. 253–271, 1999.

KESHAVAREDDY, G.; KUMAR, A. R. V.; S. RAMU, V. Methods of Plant Transformation- A Review. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 7, n. 07, p. 2656–2668, 2018.

KHAN, I. A.; DAHOT, M. U.; YASMIN, S.; et al. Effect of sucrose and growth regulators on the micropropagation of sugarcane clones. **Pak. J. Bot.**, v. 38, n. 4, p. 961–967, 2006.

KHAN, M. S.; AHMAD, W.; AHMAD, M. Z.; ULLAH, M.; JAN, A. Transformation of the OSC3H52 gene promoter in tissue culture of sugarcane. **Journal of Animal and Plant Sciences**, v. 31, n. 1, p. 156–165, 2021.

KHONGHINTAISONG, J.; SONGSRI, P.; TOOMSAN, B.; JONGRUNGKLANG, N. Rooting and Physiological Trait Responses to Early Drought Stress of Sugarcane Cultivars. **Sugar Tech**, v. 20, n. 4, p. 396–406, 2018.

KIM, Y.; CHUNG, Y. S.; LEE, E.; et al. Root response to drought stress in rice (*Oryza sativa* L.). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 4, p. 12–14, 2020.

KISHOR, POLAVARAPU BILHAN KAVI, HONG, ZONGLIE, MIAO, GUO-HUA, HU, CHEIN-AN A., VERMA, D. P. S. Overexpression of A1-Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase Increases Proline Production and Confers Osmotolerance in Transgenic Plants'. **Plant Physiology**, v. 108, p. 1387–1394, 1995.

KOHLI, A.; MIRO, B.; TWYMAN, R. M. Transgene Integration, Expression and Stability in Plants: Strategies for Improvements. In: KOLE, C.; MICHLER, C. H.; ABBOTT, A. G.; HALL, T. C. **Transgenic Crop Plants**. 1. Ed. Springer. p. 51-60. 2010.

KRISHNAN, S. Radhesh, MOHAN, Chakravarthi. Methods of Sugarcane Transformation. In: MOHAN, Chakravarthi. **Sugarcane Biotechnology: Challenges and Prospects**. São Carlos. Springer. 2017. p. 51-60

KUMAR, T.; UZMA.; KHAN, M. R.; ABBAS, Z.; ALI, G. M. Genetic improvement of sugarcane for drought and salinity stress tolerance using *Arabidopsis* vacuolar pyrophosphatase (AVP1) gene. **Biotechnol.** v.56, n. 3, p. 199-209, 2014.

KUMAR, V.; VAN STADEN, J. New insights into plant somatic embryogenesis: an epigenetic view. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, n. 9, p. 1–17, 2017.

LACORTE, C.; ARAGÃO, F. J. L.; VAINSTEIN, M. H.; RECH, E. L. Transformação Genética de Plantas. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S., BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. 1. Ed. Brasília: Embrapa. 1999. p.761-781.

LAJOLO, F. M.; YOKOYAMA, S. M.; CHEAVEGATTI GIANOTTO, A. Sugar derived from genetically modified sugarcane. **Food Science and Technology** (Brazil), v. 41, n. 1, p. 1–7, 2021.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R. J.; AITKEN, K. S.; et al. Sugarcane Biotechnology: The Challenges and Opportunities. **In Vitro Cell. Dev. Biol**, v. 41, p. 345–363, 2005.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R. J.; WANG, L.; et al. Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp . interspecific hybrids) leaf culture. **Cell biology and morphogenesis**, v. 25, p. 1007–1015, 2006.

LAKSHMANAN, P.; ROBINSON, N. Stress Physiology: Abiotic Stresses. In: P. H. Moore; F. C. Botha (Orgs.); **Sugarcane: Physiology ,Biochemistry and Functional Biology**. 1º ed, p.411–434, 2014.

LAL, M.; TIWARI, A. K.; GUPTA, G. N. Commercial Scale Micropropagation of Sugarcane : Constraints and Remedies. **Sugar Tech**, v. 17, n. 4, p. 339–347, 2015.

LAMAOU, M.; JEMO, M.; DATLA, R.; BEKKAOU, F. Heat and drought stresses in crops and approaches for their mitigation. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, n. February, p. 1–14, 2018.

LARSSON, E.; SITBON, F.; LJUNG, K.; VON ARNOLD, S. Inhibited polar auxin transport results in aberrant embryo development in Norway spruce. **New Phytologist**, v. 177, n. 2, p. 356–366, 2008.

LEHMANN, S.; FUNCK, D.; SZABADOS, L.; RENTSCH, D. Proline metabolism and transport in plant development. **Amino Acids**, v. 39, n. 4, p. 949–962, 2010.

LEVY, A.; EL-MOCHTAR, C.; WANG, C.; GOODIN, M.; ORBOVIC, V. A new toolset for protein expression and subcellular localization studies in citrus and its application to citrus tristeza virus proteins. **Plant Methods**, v. 14, n. 1, p. 1–11, 2018.

LI, C.; NONG, Q.; SOLANKI, M. K.; et al. Differential expression profiles and pathways of genes in sugarcane leaf at elongation stage in response to drought stress. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–11, 2016.

LI, J.; PHAN, T. T.; LI, Y. R.; XING, Y. X.; YANG, L. T. Isolation, Transformation and Overexpression of Sugarcane SoP5CS Gene for Drought Tolerance Improvement. **Sugar Tech**, v. 20, n. 4, p. 464–473, 2018.

LIANG, X.; ZHANG, L.; NATARAJAN, S. K.; BECKER, D. F. Proline mechanisms of stress survival. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 19, n. 9, p. 998–1011, 2013.

- LIMA, L. A. D. C. DE; SCHUSTER, I.; COSTA, A. C. T. DA. Evaluation of wheat events transformed with the p5cs gene under conditions of water stress. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 42, n. 2, p. 161–170, 2019.
- LING, H.; WU, Q.; GUO, J.; XU, L.; QUE, Y. Comprehensive selection of reference genes for gene expression normalization in sugarcane by real time quantitative RT-PCR. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. 1–10, 2014.
- LOYOLA-VARGAS, V. M. The History of Somatic Embryogenesis. In: LOYOLA-VARGAS, V.M, OCHOA-ALEJO, N. **Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications**. Springer. p. 11-22. 2016.
- LUCENA, A. L. M.; ELOI, I. B. DE O.; MANGOLIN, C. A.; MACHADO, M. DE F. P. DA S. Embriogênese Somática em Milho: Trajetória e Eficiência. **Plant Cell Cult. Micropropag.**, v. 11, n. 2, p. 33–53, 2015.
- MACHADO, R. S.; RIBEIRO, R. V.; EDUARDO, P.; MARCHIORI, R. Respostas biométricas e fisiológicas ao deficit hídrico em cana-de-açúcar em diferentes fases fenológicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 12, p. 1575–1582, 2009.
- MAHMOOD, T.; KHALID, S.; ABDULLAH, M.; et al. Insights into Drought Stress Signaling in Plants and the Molecular Genetic Basis of Cotton Drought Tolerance. **Cells**, v. 9, n. 1, 2019.
- MALHOTRA, P. K.; MITTAL, A.; CHOPRA, R.; KAUR, M.; THIND, K. S. Genetic Augmentation of Sugarcane with Stress-Inducible DREB1A Transcription Factor Using Biolistic Approach. **Sugar Tech**, v. 19, n. 5, p. 469–475, 2016.
- MARAFON, A. C. **Análise quantitativa de crescimento em Cana-de-açúcar: Uma introdução ao procedimento prático**. Embrapa Tabuleiros Costeiros, v. 168, n. 1, p. 31, 2012.
- MARIN, F.; NASSIF, D. S. P. Mudanças Climáticas e a Cana-de-açúcar no Brasil: Fisiologia, Conjuntura e Cenário Futuro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v. 17, n. 2, p. 232-239, 2013.
- MATROODI, S.; MOTALLEBI, M.; ZAMANI, M.; et al. Sugarcane (NCo310) Transient Transformation Using uidA Reporter Gene. **Iran J Biotech**, v. 11, n. 2, p. 89–95, 2013.
- MBAMBALALA, N.; PANDA, S. K.; VAN DER VYVER, C. Overexpression of AtBBX29 Improves Drought Tolerance by Maintaining Photosynthesis and Enhancing the Antioxidant and Osmolyte Capacity of Sugarcane Plants. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 39, n. 2, p. 419–433, 2020.
- MEGA, R.; ABE, F.; KIM, J. S.; et al. Tuning water-use efficiency and drought tolerance in wheat using abscisic acid receptors. **Nature Plants**, v. 5, n. 2, p. 153–159, 2019.

MÉNDEZ-HERNÁNDEZ, H. A.; LEDEZMA-RODRÍGUEZ, M.; AVILEZ-MONTALVO, R. N.; et al. Signaling overview of plant somatic embryogenesis. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. February, p. 1–15, 2019.

MILLER, G.; SUZUKI, N.; CIFTCI-YILMAZ, S.; MITTLER, R. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. **Plant, Cell and Environment**, v. 33, n. 4, p. 453–467, 2010.

MILNER, J. L.; MCCLELLAN, D. J.; WOOD, J. M. Factors reducing and promoting the effectiveness of proline as an osmoprotectant in *Escherichia coli* K12. **Journal of General Microbiology**, v. 133, n. 7, p. 1851–1860, 1987.

MITTLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 1, p. 15–19, 2006.

MOLINARI, H. B. C.; MARUR, C. J.; DAROS, E.; et al. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): Osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, v. 130, n. 2, p. 218–229, 2007.

MOLINARI, H. B. C.; MARUR, C. J.; FILHO, J. C. B.; et al. Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. **Plant Science**, v. 167, n. 6, p. 1375–1381, 2004.

MOLINARI, M. D. C.; FUGANTI-PAGLIARINI, R.; BARBOSA, D. A.; et al. Seleção de sementes de soja geneticamente modificadas com o gene marcador bar por meio do teste de germinação em solução de glufosinato de amônio. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 61, p. 1–7, 2018.

MORAIS, L. K.; CURSI, D. E.; dos SANTOS, J. M.; et al. **Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar**. 1º ed. Aracaju: Embrapa, 2015.

MORGANTE, C. V.; BLAWID, R. **Análise da Expressão Gênica pela Técnica de PCR Quantitativa em Tempo Real: Princípios e Fundamentos**. Petrolina. EMBRAPA. p. 30-41. 2016.

MOTHÉ, G. P. B., NETTO, A. T., CRESPO, L. E. C., CRESPO, E. C. Eficiência fotoquímica e características de crescimento da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) cultivada in vitro em diferentes concentrações de sacarose e qualidade de luz. **Plant Cell Culture Micropropagation**, v. 4, p. 84-91, 2008.

MUDRY, C. S.; SOUZA, D. K. K. DE; DIBAX, R.; ALCÂNTARA, G. B. DE; BESPALHOK FILHO, J. C. Embriogênese somática da cultivar RB966928 e do clone RB986419 de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 3, p. 1023–1032, 2013.

MURASHIGE T.; SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.** 15: 473–497; 1962.

NIC-CAN, G.I., LOYOLA-VARGAS, V.M. The Role of the Auxins During Somatic Embryogenesis. In: Loyola-Vargas, V., Ochoa-Alejo, N. (eds) **Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications**. Springer, Cham. 2016.

NOAA NATIONAL CENTERS FOR ENVIRONMENTAL INFORMATION. U.S. Billion-Dollar Weather & Climate Disasters 1980-2021. NCEM. Disponível em: <https://www.ncdc.noaa.gov/billions/events.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2021.

NOGUEIRA, G. F.; LUIS, Z. G.; PASQUAL, M.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. High-efficiency somatic embryogenesis of a broad range of Brazilian *Saccharum* spp. hybrids (sugarcane) varieties using explants from previously established in vitro plants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 55, n. 1, p. 26–35, 2019.

OCHOA-ALEJO, N. The Uses of Somatic Embryogenesis for Genetic Transformation. In: LOYOLA-VARGAS, V.M, OCHOA-ALEJO, N. **Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications**. Springer. 2016. p. 415-434. doi 10.1007/978-3-319-33705-0_23

OECD/FAO. **OECD-FAO Agricultural Outlook 2018-2027**. Rome: OECD Publishing, 2018.

OLIVEIRA, L. A. R. DE; CARDOSO, M. N.; OLIVEIRA, A. C. A. DE; et al. Effects of in vitro Drought Stress on Growth, Proline Accumulation and Antioxidant Defense in Sugarcane. **Journal of Agricultural Science**, v. 10, n. 5, p. 135, 2018.

OZYIGIT, I. I.; YUCEBILGILI KURTOGLU, K. Particle bombardment technology and its applications in plants. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 12, p. 9831–9847, 2020.

PARMAR, M. T.; MOORE, R. P. Carbowax 6000, Mannitol, and Sodium Chloride for Simulating Drought Conditions in Germination Studies of Corn (*Zea mays* L.) of Strong and Weak Vigor 1. **Agronomy Journal**, v. 60, n. 2, p. 192–195, 1968.

PAWLOWSKI, W. P.; SOMERS, D. A. Transgene Inheritance in Plants Genetically Engineered by Microprojectile Bombardment. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 17–30, 1996.

PIRES, R. C. M.; ARRUDA, F. B.; SAKAI, E. Irrigação e Drenagem. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M, G, A. **Cana-de-açúcar**. 1. Ed. Campinas: Instituto Agronômico, 2008. p. 631-670, 2008.

POSPISILOVA, J.; HASEL, D.; VANKOVA, R. Responses of Transgenic Tobacco Plants with Increased Proline Content to Drought and/or Heat Stress. **American Journal of Plant Sciences**, v. 2, n. 3, p. 318–324, 2011.

QIN, F.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Achievements and challenges in understanding plant abiotic stress responses and tolerance. **Plant and Cell Physiology**, v. 52, n. 9, p. 1569–1582, 2011.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. R. Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. 2016. Disponível em: <http://www.R-project.org>.

RADOEVA, T.; VADDEPALLI, P.; ZHANG, Z.; WEIJERS, D. Evolution, Initiation, and Diversity in Early Plant Embryogenesis. **Developmental Cell**, v. 50, n. 5, p. 533–543, 2019.

RAJASEKARAN, K.; MAJUMDAR, R.; SICKLER, C.; et al. Fidelity of a simple Liberty leaf-painting assay to validate transgenic maize plants expressing the selectable marker gene, bar. **Journal of Crop Improvement**, v. 31, n. 4, p. 628–636, 2017.

RAJASHEKER, G.; JAWAHAR, G.; JALAJA, N.; et al. Role and regulation of osmolytes and ABA interaction in salt and drought stress tolerance. **Plant Signaling Molecules: Role and Regulation under Stressful Environments**. p.417–436, 2019.

RAMASAMY, M.; MORA, V.; DAMAJ, M. B.; et al. A biolistic-based genetic transformation system applicable to a broad-range of sugarcane and energycane varieties. **GM Crops and Food**, v. 9, n. 4, p. 211–227, 2018.

RAMIRO, D. A.; MELOTTO-PASSARIN, D. M.; BARBOSA, M. DE A.; et al. Expression of Arabidopsis Bax Inhibitor-1 in transgenic sugarcane confers drought tolerance. **Plant Biotechnology Journal**, v. 14, n. 9, p. 1826–1837, 2016.

RAMPINO, P.; PATALEO, S.; GERARDI, C.; MITA, G.; PERROTTA, C. Drought stress response in wheat: Physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. **Plant, Cell and Environment**, v. 29, n. 12, p. 2143–2152, 2006.

RAZA, G.; SINGH, M. B.; BHALLA, P. L. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Tritordeum. **Plants**, v. 9, n. 38, p. 1–10, 2020.

RAZA, S.; QAMARUNISA, S.; HUSSAIN, M.; et al. Regeneration in sugarcane via somatic embryogenesis and genomic instability in regenerated plants. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 131–136, 2012.

REIS, R. R.; ANDRADE DIAS BRITO DA CUNHA, B.; MARTINS, P. K.; et al. Induced over-expression of AtDREB2A CA improves drought tolerance in sugarcane. **Plant Science**, v. 221–222, p. 59–68, 2014.

REJEB, K, B.; ABDELLY, C.; SAVOURÉ, A. How reactive oxygen species and proline face stress together. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 80, p. 278–284, 2014.

RIDESA. **Liberação Nacional de Variedades “RB” de cana-de-açúcar**. Curitiba: Editora Graciosa. 2015.

RIPPEY, B. R. The U.S. drought of 2012. **Weather and Climate Extremes**, v. 10, p. 57–64, 2015.

- RUIJTER, J. M.; BARNEWALL, R. J.; MARSH, I. B.; et al. Efficiency Correction Is Required for Accurate Quantitative PCR Analysis and Reporting. **Clinical chemistry**, v. 67, n. 6, p. 829–842, 2021.
- RUIZ-VILLALBA, A.; RUIJTER, J. M.; VAN DEN HOFF, M. J. B. Use and misuse of cq in qpcr data analysis and reporting. **Life**, v. 11, n. 6, p. 1–22, 2021.
- SANFORD, J. C. Biolistic plant transformation. **Physiologia Plantarum**, v. 79, n. 1, p. 206–209, 1990.
- SANFORD, J. C.; KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; ALLEN, N. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. **Particulate Science and Technology**, v. 5, n. 1, p. 27–37, 1987.
- SANFORD, J. C.; SMITH, F. D.; RUSSELL, J. A. Optimizing the Biolistic Process for Different Biological Applications. **Academic Press, INC.**, 1995.
- SANFORD, J.C.; SMITH, F.D.; RUSSELL, J.A. Optimizing the biolistic process for different biological applications. **Methods in Enzymology**, v.217, p.483-509, 1993.
- SANTOS, C. M. DOS; ENDRES, L.; DA SILVA, A. C. S.; et al. Water Relations and Osmolite Accumulation Related to Sugarcane Yield Under Drought Stress in a Tropical Climate. **International Journal of Plant Production**, v. 13, n. 3, p. 227–239, 2019.
- SANTOS, C. M.; DE ALMEIDA SILVA, M.; LIMA, G. P. P.; et al. Physiological Changes Associated with Antioxidant Enzymes in Response to Sugarcane Tolerance to Water Deficit and Rehydration. **Sugar Tech**, v. 17, n. 3, p. 291–304, 2015.
- SATHISH, D.; THEBORAL, J.; VASUDEVAN, V.; et al. Exogenous polyamines enhance somatic embryogenesis and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation efficiency in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid). **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 56, n. 1, p. 29–40, 2019.
- SCHNEIDER, V. K.; SOARES-COSTA, A.; CHAKRAVARTHI, M.; et al. Transgenic sugarcane overexpressing CaneCPI-1 negatively affects the growth and development of the sugarcane weevil *Sphenophorus levis*. **Plant Cell Reports**, v. 36, n. 1, p. 193–201, 2016.
- SCHNEIDER, C. A., RASBAND, W. S., ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, 9(7), 671–675. 2012.
doi:10.1038/nmeth.2089
- SELDIMIROVA, O. A.; KUDOYAROVA, G. R.; KRUGLOVA, N. N.; GALIN, I. R.; VESELOV, D. S. Somatic Embryogenesis in Wheat and Barley Calli in vitro Is Determined by the Level of Indoleacetic and Abscisic Acids. **Russian Journal of Developmental Biology**, v. 50, n. 3, p. 124–135, 2019.
- SHANKER, A. K.; MAHESWARI, M.; YADAV, S. K.; et al. Drought stress responses in crops. **Functional and Integrative Genomics**, v. 14, n. 1, p. 11–22, 2014.

SHRESTHA, A.; CUDJOE, D. K.; KAMRUZZAMAN, M.; et al. Abscisic acid-responsive element binding transcription factors contribute to proline synthesis and stress adaptation in Arabidopsis. **Journal of Plant Physiology**, v. 261, n. April, p. 153414, 2021.

SIDDIQUE, A.; KANDPAL, G.; KUMAR, P. Proline accumulation and its defensive role under diverse stress condition in plants: An overview. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 1655–1659, 2018.

SIGNORELLI, S.; COITIÑO, E. L.; BORSANI, O.; MONZA, J. Molecular mechanisms for the reaction between •OH radicals and proline: Insights on the role as reactive oxygen species scavenger in plant stress. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 118, n. 1, p. 37–47, 2014.

SILVEIRA, V.; DE VITA, A. M.; MACEDO, A. F.; et al. Morphological and polyamine content changes in embryogenic and non-embryogenic callus of sugarcane. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 114, n. 3, p. 351–364, 2013.

SOUZA, W. R. DE; DE OLIVEIRA, N. G.; VINECKY, F.; et al. Field evaluation of AtDREB2A CA overexpressing sugarcane for drought tolerance. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 205, n. 6, p. 545–553, 2019.

SOUZA, W. R.; PACHECO, T. F.; DUARTE, K. E.; et al. Silencing of a BAHD acyltransferase in sugarcane increases biomass digestibility. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 1–14, 2019.

SOWMYA, H. D.; USHARANI, T. R.; MOHANDAS, S. Somatic Embryogenesis as a Tool in Genetic Transformation. **Banana: Genomics and Transgenic Approaches for Genetic Improvement**. p.1–346, 2016.

STEINER, N.; FARIAS-SOARES, F. L.; SCHMIDT, É. C.; et al. Toward establishing a morphological and ultrastructural characterization of proembryogenic masses and early somatic embryos of Araucaria angustifolia (Bert.) O. Kuntze. **Protoplasma**, v. 254, n. 3, p. 1467, 2015.

STEWART, C. R. The Mechanism of Abscisic Acid-induced Proline Accumulation in Barley Leaves. **Plant Physiology**, v. 66, p. 230–233, 1980.

SU, M. X.F.; LI, X.Y.; MA, X.J.; PENG, A.G.; ZHAO, L.Q.; CHENG, S.Y.; CHEN G.S. LIU. Cloning two P5CS genes from bioenergy sorghum and their expression profiles under abiotic stresses and MeJA treatment. **Plant Science**, v. 181, p. 652–659, 2011.

SZABADOS, L.; ÁBRAHÁM, E.; ÖKÉSZ, L.; et al. Structure, function and regulation of atp5cs genes in arabidopsis. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 12, n. 2, p. 3–10, 1998.

SZABADOS, L.; SAVOURÉ, A. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 2, p. 89–97, 2010.

- TABASHNIK, B. E.; BRÉVAULT, T.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to Bt crops: Lessons from the first billion acres. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 6, p. 510–521, 2013.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**, 6ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Massachusetts: Sinauer Associates, p. 517-540. 2002.
- UNICA. **Setor sucroenergético no Brasil uma visão para 2030**. Ministério de Minas e Energia. 2016.
- VERSLUES, P. E.; SHARMA, S. Proline Metabolism and Its Implications for Plant-Environment Interaction. **The Arabidopsis Book**, v. 8, p. e0140, 2010.
- VIANNA, G. R.; ARGÃO, F. J. L.; RECH, E. L. O sistema Biobalístico. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. de C. **Manual De Transformação Genética De Plantas**. 2. Ed. Brasília: Embrapa. 2015. p.90-104.
- VON ARNOLD, S. Somatic Embryogenesis. In: E. F. George; M. A. Hall; G.-J. De Klerk (Orgs.); **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3ª ed, p.335–350, 2008.
- WANG, W. Z.; YANG, B. P.; FENG, X. Y.; et al. Development and characterization of transgenic sugarcane with insect resistance and herbicide tolerance. **Frontiers in Plant Science**, v. 8 , p. 1–10, 2017.
- WEBBER, H.; EWERT, F.; OLESEN, J. E.; et al. Diverging importance of drought stress for maize and winter wheat in Europe. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2018.
- WU, H.; AWAN, F. S.; VILARINHO, A.; et al. Transgene integration complexity and expression stability following biolistic or Agrobacterium-mediated transformation of sugarcane. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 51, n. 6, p. 603–611, 2015.
- XUE, G. P.; DRENTH, J.; MCINTYRE, C. L. TaHsfA6f is a transcriptional activator that regulates a suite of heat stress protection genes in wheat (*Triticum aestivum* L.) including previously unknown Hsf targets. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 3, p. 1025–1039, 2015.
- YANG, G.; LI, J.; LIU, W.; et al. Molecular cloning and characterization of MxNAS2, a gene encoding nicotianamine synthase in *Malus xiaojinensis*, with functions in tolerance to iron stress and misshapen flower in transgenic tobacco. **Scientia Horticulturae**, v. 183, p. 77–86, 2015.
- YAO, W.; RUAN, M.; QIN, L.; et al. Field performance of transgenic sugarcane lines resistant to sugarcane mosaic virus. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1–9, 2017.

YOU, J.; CHAN, Z. Ros regulation during abiotic stress responses in crop plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1–15, 2015.

ZHANG, M.; ZHUO, X.; WANG, J.; et al. Effective selection and regeneration of transgenic sugarcane plants using positive selection system. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 51, n. 1, p. 52–61, 2014.

ZHANG, X.; LEI, L.; LAI, J.; ZHAO, H.; SONG, W. Effects of drought stress and water recovery on physiological responses and gene expression in maize seedlings. **BMC Plant Biology**, v. 18, n. 1, p. 1–16, 2018.

ZHAO, P.; BEGCY, K.; DRESSELHAUS, T.; SUN, M. X. Does early embryogenesis in eudicots and monocots involve the same mechanism and molecular players? **Plant Physiology**, v. 173, n. 1, p. 130–142, 2017.

ZHAO, X.; JIANG, Y.; LIU, Q.; et al. Effects of Drought-Tolerant Ea-DREB2B Transgenic Sugarcane on Bacterial Communities in Soil. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1–11, 2020.

ZOUARI M., HASSENA A.B., TRABELSI L., ROUINA B.B., DECOU R., LABROUSSE P. Exogenous Proline-Mediated Abiotic Stress Tolerance in Plants: Possible Mechanisms. In: Hossain M., Kumar V., Burritt D., Fujita M., Mäkelä P. (eds) **Osmoprotectant-Mediated Abiotic Stress Tolerance in Plants**. Springer, Cham. 2019.