

ESTUDO DO PERFIL DA EXPRESSÃO GÊNICA RELACIONADO À
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE CANA-DE-AÇÚCAR

TAINÁ FARIA MARTINS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE - UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
AGOSTO DE 2013

ESTUDO DO PERFIL DA EXPRESSÃO GÊNICA RELACIONADO À EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE CANA-DE-AÇÚCAR

TAINÁ FARIA MARTINS

Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientador: Vanildo Silveira

Co-orientador: Álvaro Fabrício Lopes Rios

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

AGOSTO DE 2013

**ESTUDO DO PERFIL DA EXPRESSÃO GÊNICA RELACIONADO À
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE CANA-DE-AÇÚCAR**

TAINÁ FARIA MARTINS

Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biotecnologia da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia e Biotecnologia.

Aprovada em 30 de Agosto de 2013.

Comissão examinadora:

Profa. Dra. Virginia Silva Carvalho (D.Sc. Fitotecnia) - UENF

Prof. Dr. Marco Antônio Lopes Cruz (D. Sc. Biotecnologia e Biotecnologia) - UFRJ

Prof. Dr. Gonçalo Apolinário de Souza Filho (D.Sc. Genética Vegetal) - UENF

Prof. Dr. Álvaro Fabrício Lopes Rios (D.Sc. Genética) – UENF (Co-orientador)

Prof. Dr. Vanildo Silveira (D.Sc. Biotecnologia Vegetal) – UENF (Orientador)

"Construí amigos, enfrentei derrotas,
venci obstáculos, bati na porta da vida
e disse-lhe: Não tenho medo de vivê-la."

Augusto Cury

Aos meus pais, Angela e Marco Aurélio.
Pelo amor, carinho e apoio incondicional
em todos os momentos da minha vida.
Pelo exemplo e sábios ensinamentos.

Dedico.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, primeiramente, por me guiar durante toda essa trajetória.

Aos meus pais, Angela e Marco, pelo amor e carinho, incentivo e apoio em todos os momentos, e que não mediram esforços aos meus estudos.

Ao meu amor Junior, que é um anjo na minha vida e me deu força e carinho, que sempre me estimulou para que eu finalizasse mais uma etapa e esteve presente em cada dificuldade no caminho e em cada resultado obtido.

Á minha irmã, Lorrane e meu cunhado Vitor, pelos momentos de desabafo e descontração, pelo companheirismo e compreensão.

Aos meus cunhados Aninha e Buit, pessoas que aprendi a amar e hoje são indispensáveis na minha vida, que estiveram presentes no desenvolver de todo meu projeto.

A toda minha família, avós, tios e primos, pela força e todo apoio diante das minhas decisões.

As meus amigos de sempre que mesmo distantes, estiveram ao meu lado e me deram muita força.

A Luana, minha amiga-irmã, que esteve comigo por todo o tempo, que me aturou 24h por dia, pelos desabafos, conversas e momentos de descontração.

Aos meus amigos da UENF, que foram minha família em Campos, pela convivência diária, conversas, risadas e desabafos.

Ao meu orientador, Prof. Vanildo, pela confiança, apoio, amizade, compreensão nos momentos difíceis e por fim valiosa orientação.

Ao Prof. Álvaro, pela co-orientação, pela dedicação, por me ensinar, ir para bancada comigo, estar disponível para qualquer dúvida que tivesse, pela paciência, estímulo e ensinamentos.

A Paula, que esteve do meu lado durante todo o trabalho, me ensinando, me ajudando, me dando todo o suporte pra realização deste.

Ao meu grupo de trabalho por todo o suporte no dia-a-dia.

Aos laboratórios, LBT, LBCT e LRMGA por disponibilizarem o espaço e equipamentos para o desenvolvimento do trabalho.

A SUCEST, por nos darem a oportunidade de trabalharmos com o banco de dados de cana-de-açúcar.

Às agencias de fomento CNPq, CAPES e FAPERJ, pelo aporte financeiro dado ao projeto de pesquisa.

À UENF pela bolsa de estudos e ensino gratuito e de qualidade.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente colaboraram para o desenvolvimento desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
RESUMO	X
ABSTRACT	XII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A cana-de-açúcar	1
1.2. O genoma da cana-de-açúcar	2
1.3. Cultura de tecidos	3
1.4. Embriogênese somática	4
1.4.1. Indução e multiplicação da embriogênese somática	6
1.4.2. Maturação da embriogênese somática	7
1.5. Expressão gênica na embriogênese somática	9
2. OBJETIVO	12
2.1. Objetivo geral	12
2.2. Objetivos específicos	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Material Vegetal	13
3.2. Indução de calos	13
3.3. Manutenção e multiplicação das culturas embriogênicas e não-embriogênicas	15
3.4. Maturação das culturas embriogênicas e não-embriogênicas	16
3.5. Identificação in silico dos genes de interesse	17
3.6. Construção dos Primers	17
3.7. Extração de RNA dos calos embriogênicos e não-embriogênicos	18
3.8. Quantificação do RNA	18
3.8.1. Tratamento com DNase I	19
3.9. Transcrição Reversa (RT)	19
3.10. PCR (Reação em Cadeira de Polimerase)	19
3.11. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	20
3.12. Coloração do gel de poliacrilamida	20
3.13. PCR quantitativo (qPCR)	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22

4.1. Análise in silico e construção dos primers	22
4.2. Análise da abundância de transcritos ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) através de análise dos resultados de PCR quantitativo (qPCR).....	35
5. CONCLUSÃO	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modulação da embriogênese somática.....	5
Figura 2. Caracterização do gene SERK. Contendo seus diferentes domínios.....	10
Figura 3. Esquema da obtenção dos explantes primários na regeneração de plantas via embriogênese somática em cana-de-açúcar.....	14
Figura 4. Cilindro central da cana-de-açúcar contendo folhas jovens.....	15
Figura 5. Corte longitudinal mostrando o meristema apical da cana-de-açúcar.....	15
Figura 6. Aspectos morfológicos de calo embriogênico (CE) e calo não-embriogênico (CNE) de cana-de-açúcar.....	16
Figura 7. Alinhamento das sequências de <i>PKL</i> de Arabidopsis e cana-de-açúcar pelo programa <i>MultAlin</i>	24
Figura 8. Alinhamento das sequências de <i>CLF</i> de Arabidopsis e cana-de-açúcar pelo programa <i>MultAlin</i>	25
Figura 9. Alinhamento das sequências de <i>LEC1</i> de sorgo, milho e cana-de-açúcar pelo programa <i>MultAlin</i>	26
Figura 10. Alinhamento das sequências de <i>SERK1</i> de milho e cana-de-açúcar pelo programa <i>MultAlin</i>	27
Figura 11. Alinhamento das sequências de <i>SERK2</i> de milho e cana-de-açúcar pelo programa <i>MultAlin</i>	28
Figura 12. Sequência dos <i>primers</i> do gene <i>PKL</i> de cana-de-açúcar alinhados a sequência de seu respectivo <i>amplicon</i> e demais sequências homólogas.....	31
Figura 13. Sequência dos <i>primers</i> do gene <i>CLF</i> de cana-de-açúcar alinhados a sequência de seu respectivo <i>amplicon</i> e demais sequências homólogas.....	31
Figura 14. Sequência dos <i>primers</i> do gene <i>LEC1</i> de cana-de-açúcar alinhados a sequência de seu respectivo <i>amplicon</i> e demais sequências homólogas.....	32
Figura 15. Sequência dos <i>primers</i> do gene <i>SERK1</i> de cana-de-açúcar alinhados a sequência de seu respectivo <i>amplicon</i> e demais sequências homólogas.....	32
Figura 16. Sequência dos <i>primers</i> do gene <i>SERK2</i> de cana-de-açúcar alinhados a sequência de seu respectivo <i>amplicon</i> e demais sequências homólogas.....	33
Figura 17. Gel de eletroforese das amostras de calos embriogênico (CE), não-embriogênico (CNE) com os transcritos de <i>GAPDH</i>	34
Figura 18. Gel de eletroforese das amostras de calos embriogênico (CE), não-embriogênico (CNE) com os transcritos de <i>GAPDH</i>	34

Figura 19. Gel de eletroforese das amostras de folha e meristema (controles) com os transcritos de <i>GAPDH</i> .	35
Figura 20. Resultado dos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para o gene <i>PKL</i> nos calos embriogênicos e não-embriogênicos durante a multiplicação e maturação, folhas e meristema.	37
Figura 21. Resultado da média dos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para o gene <i>PKL</i> nos calos embriogênicos e não-embriogênicos durante a multiplicação e maturação, folhas e meristema.	38
Figura 22. Resultado dos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para o gene <i>LEC1</i> nos calos embriogênicos e não-embriogênicos durante a multiplicação e maturação, folhas e meristema.	39
Figura 23. Resultado da média dos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para o gene <i>LEC1</i> nos calos embriogênicos e não-embriogênicos durante a multiplicação e maturação, folhas e meristema.	40
Figura 24. Resultado dos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para o gene <i>SERK1</i> nos calos embriogênicos e não-embriogênicos durante a multiplicação e maturação, folhas e meristema.	41
Figura 25. Resultado da média dos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para o gene <i>SERK1</i> nos calos embriogênicos e não-embriogênicos durante a multiplicação e maturação, folhas e meristema.	42
Figura 26. Resultado dos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para o gene <i>SERK2</i> nos calos embriogênicos e não-embriogênicos durante a multiplicação e maturação, folhas e meristema.	43
Figura 27. Resultado da média dos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para o gene <i>SERK2</i> nos calos embriogênicos e não-embriogênicos durante a multiplicação e maturação, folhas e meristema.	44

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D – ácido diclorofenóxiacético

ABA – Ácido abscísico

C – controle

CA – Carvão Ativado

CLF – Curly Leaf

CE – Calos embriogênicos

CNE – Calos não-embriogênicos

DEPC – Dietil-pirocarbonato

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

Emu – Embriogênico multiplicação

Ema – Embriogênico maturação

F – folhas jovens do cilindro central da cana

GAPDH – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

iPS – induced pluripotent stem cells

LEC1 – Leafy Cotyledon 1

M – meristema apical

Meio MS – Meio de cultura Murashige e Skoog (1962)

Nemu – Não-embriogênico multiplicação

Nema – Não-embriogênico maturação

PBS – tampão fosfato-salino

PEG – polietileno glicol

PKL – Pickle

SERK – Somatic embryogenesis receptor kinase

TBE – Tampão Tris-Borato-EDTA

TEMED – Tetra-metil-etilenodiamina

TF – Fatores de transcrição (Transcription Factors)

RESUMO

A cana-de-açúcar é uma das culturas com maior importância econômica mundial, sendo responsável por aproximadamente 70% do açúcar produzido, além de ser uma fonte cada vez mais importante de biocombustível. No sistema produtivo de cana-de-açúcar, as técnicas biotecnológicas, como a embriogênese somática e de transformação genética, apresentam um grande potencial de aplicação e integração em programas de melhoramento genético e tecnológicos, que visam o aumento do potencial produtivo. O objetivo do trabalho foi estudar os perfis de expressão de genes associados com a determinação da competência embriogênica em culturas embriogênicas e não-embriogênicas de cana-de-açúcar. Adicionalmente, o projeto teve como objetivos específicos: I) Identificação *in silico* de sequências dos genes de interesse depositadas no Genbank e SUCEST, associados com o controle da embriogênese zigótica e somática em monocotiledôneas; II) Determinar o padrão de expressão gênica em culturas embriogênicas e não-embriogênicas, visando a compreensão dos genes no desenvolvimento embrionário e na determinação da competência embriogênica. Com esse intuito, foram realizadas análises *in silico* e construídos *primers* para 5 genes de interesse: *SERK1* (*SomaticEmbryogenesis Receptor Kinase 1*), *SERK 2*, *LEC1* (*LeafyCotyledonar 1*), *PKL* (*Pickle*) e *CLF* (*CurlyLeaf*). Culturas embriogênicas (CE) e não-embriogênicas (CNE) foram estabelecidas, subcultivadas e coletadas para análises qualitativas e quantitativas da expressão gênica dos genes analisados. Foram coletados também amostras de folhas jovens e do meristema apical para controle dos experimentos. Os resultados obtidos para as análises *in silico* mostraram que a cana-de-açúcar possui alta homologia com as espécies alinhadas, tais como, sorgo, milho e *arabidopsis*. Para os resultados do q-PCR, obtivemos um perfil de expressão na análise de abundância dos transcritos entre os calos embriogênicos e calos não-embriogênicos. A análise dos resultados demonstra que os perfis de expressão são diferentes e em alguns casos antagônicos entre amostras de culturas embriogênicas e não-embriogênicas. Estudos visando a caracterização da expressão destes genes podem auxiliar na elucidação de mecanismos básicos relacionados a fisiologia, bioquímica e biologia molecular da embriogênese somática, além de auxiliar na compreensão da regulação deste processo morfogênético em cana-de-açúcar. E possibilitarão a identificação de culturas com competência para embriogênese e o monitoramento do

desenvolvimento adequado dos embriões somáticos nestas espécies de interesse científico e tecnológico.

ABSTRACT

The sugarcane is one of the most economically important crops worldwide, accounting for approximately 70% of the sugar produced, besides being an increasingly important source of biofuel. The biotechnological techniques in productive system of sugarcane, such as somatic embryogenesis and genetic transformation, have a great potential of application and integration into breeding programs and technology aimed at increasing the productive potential. The objective was to study the control of gene expression profiles associated with the determination of embryogenic competence in embryogenic and non-embryogenic cultures of sugarcane. Additionally, the project had the following specific objectives: i) in silico identification of genes of interest deposited in Genbank and SUCEST associated with the zygotic and somatic embryogenesis control in monocots and ii) determine the pattern of gene expression in embryogenic and non-embryogenic culture, aimed the genes understanding in embryonic development and in determining embryogenic competence. With this intention, we performed in silico analysis and the primers were constructed for five interest genes: *SERK1* (Somatic embryogenesis receptor kinase 1), *SERK2*, *LEC1* (Leafy Cotyledonar 1), *PKL* (Pickle) and *CLF* (Curly Leaf). Embryogenic (CE) and non-embryogenic cultures (CNE) were established, subcultured and collected for qualitative and quantitative analysis of gene expression of the genes analyzed. Were also collected samples of young leaves and apical meristem to control experiments. The results for the in silico analysis showed that the sugarcane has high homology with the aligned species such as sorghum, maize and Arabidopsis. The q-PCR results, obtained an expression profile in analysis of abundance of transcripts between embryogenic and non-embryogenic callus. The results demonstrate that expression profiles are different and in some cases antagonistic to embryogenic and non-embryogenic samples culture. Studies to characterize the expression of these genes may help to elucidate the basic mechanisms related to physiology, biochemistry and molecular biology of somatic embryogenesis, and help in understanding the regulation of this morphogenetic process in sugarcane. And enable the identification of cultures with competence for embryogenesis and monitoring the proper development of somatic embryos in these species of scientific and technological interest.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta alógama do gênero *Saccharum* pertencente à família Poaceae. O gênero *Saccharum* é formado por pelo menos cinco espécies: *Saccharum officinarum*, *Saccharum sinensis*, *Saccharum barberi*, *Saccharum spontanium*, *Saccharum robusyum*. As cultivares de cana-de-açúcar cultivadas em escala comercial representam um híbrido multi-específico, que recebe a denominação *Saccharum* spp (Veiga *et al.*, 2006). A maioria das variedades modernas são provenientes de hibridações intra e interespecíficas entre as espécies *S. spontaneum* e *S. officinarum* (Stevenson, 1965). A espécie *S. spontaneum* é tida como responsável pelo vigor vegetativo e resistência a estresses bióticos e abióticos enquanto que *S. officinarum* contribui com alto teor de açúcar (Ming *et al.*, 1998).

A propagação cana-de-açúcar é predominantemente vegetativa, através do uso de segmentos nodais (toletes). É cultivada em regiões tropicais e subtropicais, em mais de 120 países (Singh *et al.*, 2008; Waclawovsky *et al.*, 2010; Belintani *et al.*, 2012), é uma das mais antigas e mais importantes culturas na economia mundial, tendo sua origem na Nova Guiné, ainda no período Neolítico (Vettore *et al.*, 2003; Chengalrayan *et al.*, 2005). No final do século XV, a cana-de-açúcar chegou às Américas com a segunda expedição de Cristóvão Colombo. As primeiras mudas de cana-de-açúcar plantadas no Brasil foram introduzidas por Martim Afonso de Souza provenientes da Ilha da Madeira (Beauclair, 2009).

No século XVII o Brasil já era o maior produtor e fornecedor mundial de açúcar (Marques *et al.*, 2009). Porém, a economia açucareira no Brasil sofreu uma crise em 1929, devido ao aumento da utilização do açúcar de beterraba (Veiga *et al.*, 2006). Em 1975, o Governo Federal cria o Programa Nacional do Álcool (PROÁLCOOL) gerando subsídio para implantação de destilarias de álcool no país e para o desenvolvimento das plantações de cana-de-açúcar (Santiago *et al.*, 2006).

A partir de 1979, a indústria automobilística brasileira lançou no mercado seus primeiros modelos de carros movidos a álcool (Veiga *et al.*, 2006). Em 1985, as vendas totais desses modelos movidos a álcool chegaram a representar 95% (Santiago *et al.*, 2006). Mas, a partir de 1990 o setor sucroalcooleiro nacional volta a

sofrer interferências políticas importantes. Já em 2003, o sucesso do lançamento dos veículos flex fuel, novamente impulsionando o consumo de álcool, aquecendo a produção de cana-de-açúcar (Veiga *et al.*, 2006).

Atualmente, o Brasil possui posição de destaque no setor canavieiro, uma vez que o país é o maior produtor e exportador de etanol e açúcar (Thiebaut *et al.*, 2012). A produção e processamento de cana-de-açúcar representam quase dois terços da produção mundial de açúcar (Prabu e Prasad, 2012). De acordo com o segundo levantamento da safra 2013/2014 feito pela Conab (Companhia Nacional de Abastecimento), a produção nacional está estimada em 652,02 milhões de toneladas, com aumento de 10,70% em relação à safra 2012/13. A produtividade média brasileira está estimada em 74.1 t/ha, maior que a safra 2012/13, que foi de 69.4 t/ha. (Conab, 2013).

Devido à sua importância na indústria agrícola global grande aporte de esforços e recursos têm sido investidos em pesquisas voltadas ao setor sucroalcooleiro do País. A crescente produção de cana no Brasil tem sido mantida, dentre outros fatores, pelo aumento da área cultivada e desenvolvimento de novas cultivares mais produtivas. Parte das pesquisas tem incidido sobre o melhoramento de cultivares de cana-de-açúcar por meio de ferramentas biotecnológicas (Chengalrayan *et al.*, 2005; Thiebaut *et al.*, 2012).

1.2. O genoma da cana-de-açúcar

Devido a sua origem multiespecífica, a partir dos cruzamentos interespecíficos sucessivos e do melhoramento genético dessas espécies, a cana possui um genoma bastante complexo, com alto grau de poliploidia, com número de cromossomos variando entre 100 e 130 (Taparia *et al.*, 2012).

O alto nível de ploidia e o requerimento de condições climáticas específicas para o florescimento e produção de sementes viáveis estão entre as maiores limitações para o melhoramento de cana-de-açúcar através de técnicas convencionais (Piperidis *et al.*, 2010). D'Hont e colaboradores (1998) determinaram por técnicas e citogenética molecular que o número cromossômico básico de *S. officinarum* é $x=10$ e de *S. spontaneum* é $x=8$, assim esclarecendo as diferenças de ploidia de cada espécie, que vão de 5 a 16 (Grivet e Arruda, 2002). Além disso,

muitas variedades de cana-de-açúcar não produzem sementes férteis, e devido a dificuldades de autofecundação e autocruzamento, a cultura é uma das espécies de plantas que não poderia ser produzida comercialmente sem intervenção humana (Asad *et al.*, 2009).

Embora o arroz seja uma espécie-modelo de monocotiledôneas tendo como um conjunto básico de cromossomos de 389 Mpb, estima-se que o tamanho do conjunto básico de cromossomos em cana corresponda de 760 a 926 Mpb, isto é, um tamanho similar ao do sorgo, que tem um tamanho de 760 Mpb. Sendo assim, o sorgo é uma das plantas com interesse agrônômico mais próximo filogeneticamente da cana-de-açúcar (Menossi *et al.*, 2008).

O projeto SUCEST (*Sugarcane Expressed Sequence Tags*) foi iniciado em 2000 sob a coordenação da Fundação de Amparo a Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP) com o objetivo de sequenciar os genes expressos em cana-de-açúcar em diferentes tecidos e condições fisiológicas, a partir de uma estratégia transcriptômica (Vettore *et al.*, 2001). O projeto gerou aproximadamente 238.000 ESTs, e as sequências foram reunidas em 43.141 clusters (Menossi *et al.*, 2008). As sequências do SUCEST foram obtidas a partir de 26 diferentes bibliotecas de cDNA (Vettore *et al.*, 2003).

1.3. Cultura de tecidos

A biotecnologia vegetal tem o potencial de superar problemas e possibilitar o melhoramento da cana-de-açúcar, por meio de técnicas de cultura de tecidos a nível celular e de engenharia genética a nível molecular, trazendo novas oportunidades para a produção de cultivares geneticamente superiores, com alta qualidade de plantio, tendo as características desejadas (Chengalrayan *et al.*, 2005; Asad *et al.*, 2009).

A utilização da biotecnologia vegetal no melhoramento genético de plantas associada ao melhoramento genético tradicional, está vinculada ao desenvolvimento e aprimoramento de protocolos de regeneração *in vitro* a partir da cultura de células e/ou de tecidos, incluindo a embriogênese somática (Cidade *et al.*, 2006).

A produção de mudas *in vitro* de cana-de-açúcar é um método biotecnológico bem estabelecido no Brasil, tendo como principais resultados a produção de mudas

mais sadias e uniformes em uma velocidade muito mais rápida do que qualquer método convencional de propagação (Lee *et al.*, 2007). Protocolos eficientes para a regeneração *in vitro* são, também, fundamentais na utilização de técnicas de transformação genética, que oferecem novas possibilidades para a obtenção de cultivares com características de interesse (Cidade *et al.*, 2006).

Entretanto, os avanços na engenharia genética em cana-de-açúcar foram obtidos a partir do final da década de 90, quando Arencibia e colaboradores (1998) publicaram os primeiros relatos de transformação de cana-de-açúcar, determinando a importância de fatores, como o uso de culturas jovens de células e a pré-indução de organogênese ou embriogênese, no sucesso do método.

1.4. Embriogênese somática

A embriogênese somática é o processo pelo qual células somáticas isoladas, ou pequenos grupos de células resultam na formação de embriões somáticos, sendo um processo biológico análogo a embriogênese zigótica e que expressa a totipotencialidade das células vegetais (Tautorus *et al.*, 1991; Zimmerman, 1993). Neste processo, células somáticas diferenciadas e mitoticamente quiescentes podem recuperar o potencial embriogênico e originar novos embriões viáveis, através da reprogramação da expressão gênica (Marsoni *et al.*, 2008).

Há evidências de que os principais processos metabólicos e de desenvolvimento que ocorrem na embriogênese zigótica, podem ser reproduzidos na embriogênese somática, não sendo limitada pela quantidade de tecido ou acessibilidade, como ocorre na embriogênese zigótica (Fehér *et al.*, 2003). A embriogênese somática pode ser amplamente estudada por fornecer um sistema modelo para o estudo de diferentes aspectos relacionados ao processo de desenvolvimento da planta, como a competência embriogênica que, em geral, se manifesta após a mudança de uma ou mais condições de cultivo como meio de cultura, composição de reguladores de crescimento vegetal, fonte de carboidrato, potencial osmótico, dentre outras. Após essas alterações, células ou tecidos induzidos alcançam a segunda fase ou fase de expressão, na qual as células se diferenciam em embriões somáticos revelando sua competência embriogênica (Jimenez *et al.*, 2005).

A modulação da embriogênese somática pode ser obtida em um sistema tecnológico de duas fases (Figura 1). Na primeira fase, de indução e multiplicação, as culturas embriogênicas são induzidas em meios de cultura suplementados com auxinas, sendo a mais utilizada o ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), uma auxina sintética. Essas culturas passam por processos de multiplicação, em ciclos repetitivos de divisões celulares. Na segunda fase, chamada fase de maturação, as culturas são estimuladas a prosseguir o seu desenvolvimento pela retirada da auxina do meio de cultura e a utilização de promotores de maturação, como o ácido abscísico (ABA), poliaminas, citocininas e o carvão ativado (CA), sendo nesta fase mantidos em exposição à luz. Como produtos desse ciclo são obtidos embriões somáticos maduros que podem ser convertidos em plantas em condições *in vitro* e *ex vitro* (Steiner *et al.*, 2008).

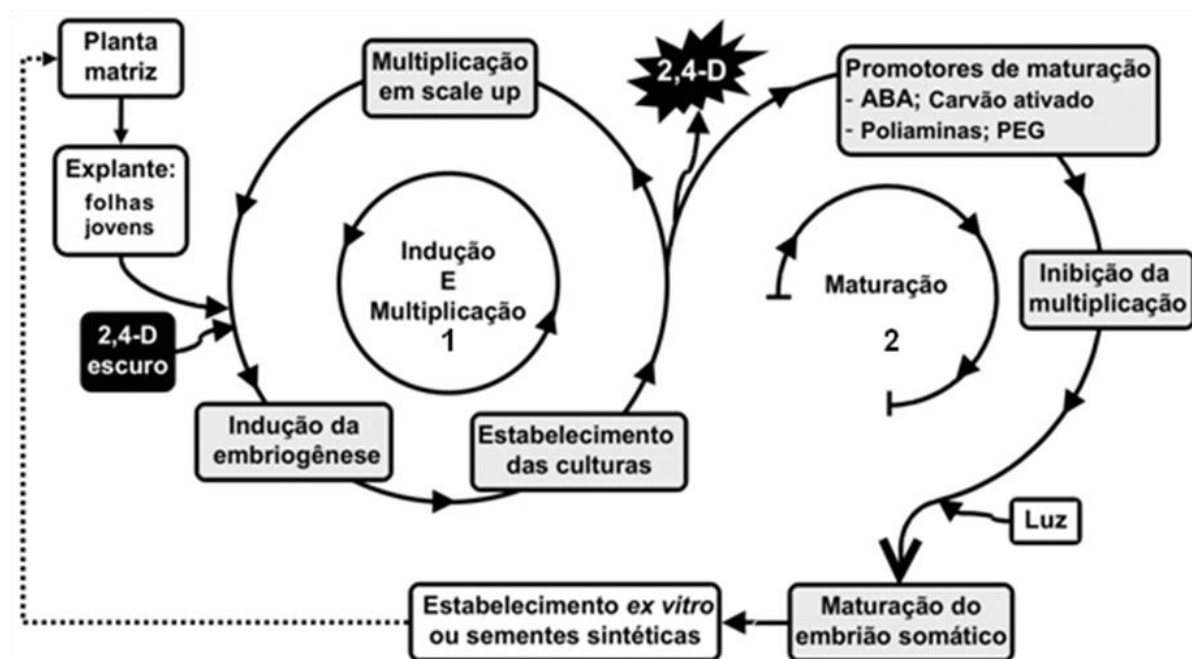


Figura 1. Modulação da embriogênese somática: (1) ciclos de indução e multiplicação e (2) ciclo de maturação (Modificado de Steiner *et al.*, 2008).

Esta rota morfogenética *in vitro* possui aplicações importantes para a multiplicação massal de genótipos superiores e também na obtenção de sistemas biológicos de referência para os estudos de fisiologia, bioquímica, moleculares e morfogenéticos do desenvolvimento embrionário (Guerra *et al.*, 1999; Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006). O uso de embriões somáticos tem sido relatado como sendo

eficaz para a obtenção de um grande número de clones comerciais de cana-de-açúcar, e pode ser obtido diretamente (Manickavasagam e Ganapathi, 1998), ou indiretamente (Guiderdoni e Demarly, 1988).

No modelo direto, os embriões somáticos originam-se dos tecidos-matrizes, sem a formação de estágios intermediários de calo (Guerra *et al.*, 1999). O outro corresponde ao modelo indireto, no qual os embriões somáticos se formam a partir de um calo, que representa células em diferentes estágios de diferenciação e, conseqüentemente, com diferentes graus de determinação, podendo adquirir novas competências mediadas por mensageiros químicos específicos (Guerra *et al.*, 1999). Estes processos envolvem mecanismos complexos de reativação celular, divisão, reprogramação do metabolismo e desenvolvimento (Fehér *et al.*, 2006; Floh *et al.*, 2007).

A embriogênese somática tem como vantagens a obtenção de uma grande quantidade de propágulos (embriões somáticos), permite um alto grau de automatização, produção de embriões somáticos de forma sincronizada, com alto grau de uniformização, representa uma ferramenta de possível integração a programas de melhoramento genético clássico, em especial quando associada às técnicas de criopreservação e engenharia genética, além de ser um modelo de estudos para o desenvolvimento embrionário (Guerra *et al.*, 1999; Steiner *et al.*, 2008).

1.4.1. Indução e multiplicação da embriogênese somática

O desenvolvimento do embrião somático, assim como do embrião zigótico, ocorre em uma ordem sequencial, onde estágios podem ser diferenciados: a divisão celular, a diferenciação e a maturação (Nieves *et al.*, 2008). A indução e a multiplicação de culturas embriogênicas é uma das etapas mais importantes do protocolo de embriogênese somática (Guerra *et al.*, 1999). A seleção do explante, idade da cultura, genótipo, tempo e número de subcultivos, uso de fitormônios, composição do meio, condições de cultivo e método de regeneração são aspectos de grande importância na estabilidade genética de plantas regeneradas através da micropropagação (Silvarolla, 1992; Rout *et al.*, 2006).

As auxinas são as substâncias responsáveis pelo desencadeamento dos processos de desdiferenciação (modelos indiretos) e rediferenciação (modelos

diretos) durante a indução, alterando a determinação e conferindo novas competências às células responsivas presentes nos explantes (Guerra *et al.*, 1999). O 2,4-D (ácido diclorofenóxiacético) é o regulador de crescimento utilizado na maioria dos sistemas de cultura de células e tecidos embriogênicos (Fehér *et al.*, 2003) e provou ser o mais potente para a indução de calos embriogênicos de cana-de-açúcar (Lakshmanan, 2006a).

As culturas resultantes do ciclo de indução e multiplicação podem possuir capacidade embriogênica distinta. Morfologicamente é possível diferenciar os tipos de calos de cana-de-açúcar, em calos embriogênicos (CE) e calos não-embriogênicos (CNE) (Lakshmanan, 2006a), mas pouco se sabe sobre os eventos bioquímicos e moleculares que ocorrem quando células somáticas tornam-se competentes para produzir embriões somáticos (Nieves *et al.*, 2003). Assim, informações valiosas podem ser obtidas através do monitoramento de variáveis bioquímicas, uma vez que estas têm sido demonstradas como potenciais discriminadores entre tecidos embriogênicos e não-embriogênicos (Nieves *et al.*, 2008). CE e CNE podem ser visualmente diferenciados por sua morfologia, os CE são caracterizados por apresentarem aspecto nodular opaco e facilmente destacável e coloração amarelada, enquanto que os CNE são mucilaginosos e translúcidos (Lakshmanan, 2006a; Silveira *et al.*, 2013). Nieves e colaboradores (2003) observaram ainda que CE de cana-de-açúcar apresentam maior atividade metabólica e maior velocidade no desenvolvimento, formando plantas por embriogênese somáticas, enquanto os CNE possuem menor atividade metabólica, crescem lentamente, de forma desordenada, e formam brotos ou raízes por organogênese.

1.4.2. Maturação da embriogênese somática

O principal esforço para a otimização do sistema de embriogênese somática em muitas espécies concentra-se principalmente, nas fases de maturação e germinação dos embriões somáticos, sendo que os meios de culturas são manipulados quanto ao tipo e concentrações de reguladores de crescimento vegetal, principalmente pela adição de agentes de maturação, como: ABA, agentes osmóticos (polietilenoglicol (PEG) e carboidratos) e CA (Thorpe, 1995; Lakshmanan, 2006a).

Muitos trabalhos têm descrito a utilização do CA como um promotor das respostas da maturação da embriogênese somática. O CA embora não seja um regulador de crescimento, vêm sendo utilizado com frequência para otimizar ou regular a morfogênese *in vitro* (Lameira *et al.*, 1997; Pan e Staden, 1999; Nhut *et al.*, 2001). O seu efeito benéfico é atribuído à absorção de substâncias inibitórias do crescimento e desenvolvimento vegetal (Thomas, 2008).

No grupo de trabalho, estão sendo realizados estudos em bioquímica, fisiologia, morfologia e proteômica dos diferentes CE e CNE, tanto durante a multiplicação quanto na maturação das culturas de cana-de-açúcar. Além disso, uma melhor compreensão de eventos bioquímicos e moleculares que ocorrem durante a embriogênese somática é essencial para aumentar a eficiência do desenvolvimento de embriões (Silveira *et al.*, 2004, 2006) e gerar prováveis marcadores bioquímicos para a competência embriogênica e qualidade dos embriões formados (Klimaszewska *et al.*, 2004).

Distúrbios genéticos têm sido detectados na embriogênese somática de uma grande variedade de plantas, mas sua ocorrência e extensão dependem da constituição genética das células em cultivo (George, 2008). Plantas produzidas vegetativamente em cultura de tecidos podem diferir das plantas das quais foram derivadas, por variações causadas por diferentes parâmetros; como a luz, oxigênio, dióxido de carbono, nutrientes, água e temperatura, dentre outros; induzindo assim respostas específicas. Estas respostas envolvem a modulação da expressão gênica, decisiva para a adaptação da planta (Smulders e Klerk, 2011; Chinnusamy e Zhu, 2009).

A principal limitação dos sistemas de ES, desenvolvidos para várias espécies, é a variação somaclonal ocorrida após sucessivas subculturas, afetando o desenvolvimento das plantas produzidas (Lakshmanan *et al.*, 2005). A variação somaclonal é composta de diversos tipos de alterações, que podem se expressar nos níveis fenotípicos, de ploidia, cromossômico e molecular. Desta forma, variação somaclonal é um termo amplo, que abrange qualquer fenômeno que pode causar variação genética ou epigenética, encontrada em mudanças fenotípicas nas plantas regeneradas (Peredo *et al.*, 2008; Rhee *et al.*, 2010). Os mecanismos exatos que induzem a variação somaclonal, ainda não são totalmente elucidados devido à complexidade dos mecanismos adjacentes ao surgimento desse tipo de variabilidade fenotípica (Tanurdzic *et al.*, 2008).

1.5. Expressão gênica na embriogênese somática

Durante o desenvolvimento do embrião, um plano do corpo é estabelecido, no qual ocorre a diferenciação de um meristema basal da raiz e um meristema apical do caule. O desenvolvimento e a diferenciação destes meristemas durante a embriogênese é controlada por diversos genes (Dong e Dunstan, 2000; Willemsen e Scheres, 2004). Vários genes que codificam proteínas regulatórias ou que atuam na cascata de sinalização das fases de indução e desenvolvimento de embriões somáticos têm sido identificados e utilizados como marcadores de transição da fase vegetativa para a embriogênese (Koehler, 2010). Consequentemente, o entendimento de como esse conjunto de genes controlam o comportamento celular pode facilitar a compreensão do processo de desenvolvimento.

Um dos primeiros genes descritos como envolvidos na expressão da competência celular foi o *Somatic Embryogenesis Receptor Kinase (DcSERK)*, em cultura de tecidos de cenoura (*Daucus carota*) (Schmidt *et al.*, 1997). O gene *SERK* faz parte de uma família multigênica de receptores de proteínas do tipo quinase, que compreendem proteínas integrais de membrana com três domínios característicos: um domínio extracelular, um domínio transmembranar e um domínio quinase (Becraft, 1998).

Estruturalmente, estas se diferem umas das outras pela presença de diferentes motivos no domínio extracelular e estão relacionados a receptores quinases de animais (Becraft, 1998; Shiu e Bleecker, 2001; Becraft, 2002). As proteínas *SERK* possuem uma organização bastante conservada. O domínio extracelular é constituído por um peptídeo sinal, seguido por um zíper de leucina, cinco repetições ricas em leucina (LRR) e uma região rica em prolina (SPP). A região SPP ocorre exclusivamente em proteínas *SERK*, servindo como uma marca para identificação destas proteínas. Regiões ricas em prolina são também características das extensinas, sugerindo ser uma possível região de interação com a parede celular (Schmidt *et al.*, 1997; Hecht *et al.*, 2001). O motivo LRR está envolvido em interação proteína-proteína (Kobe e Kajava, 2001) e o domínio quinase intracelular catalisa a fosforilação de resíduos de serina e treonina de proteínas alvos, desencadeando uma cascata de transdução de sinais (Hanks, 2003) (Figura 2).

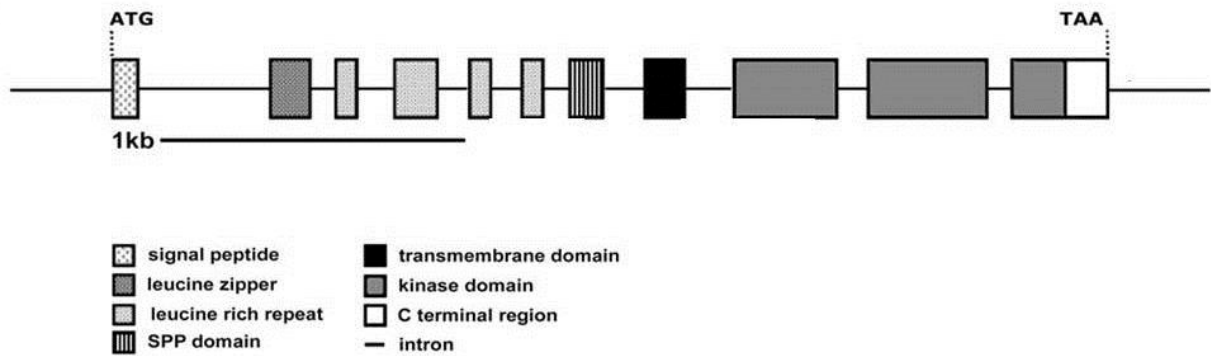


Figura 2. Caracterização do gene SERK. Contendo seus diferentes domínios. (Modificado de Albrecht et al., 2005).

Hecht e colaboradores (2001) verificaram a existência de cinco genes *SERK* em *Arabidopsis*. A expressão de um desses genes, denominado *AtSERK1*, isolado de *Arabidopsis thaliana*, foi correlacionada com o processo de formação de células embriogênicas (Salaj *et al.*, 2008). Em *Medicago truncatula* a expressão de *SERK1* além de estar envolvida na embriogênese zigótica e somática e na formação de feixes vasculares, tem sido atribuída à formação de nódulos radiculares de fixação de nitrogênio, enfatizando a função deste gene em eventos de reprogramação celular (Nolan *et al.*, 2009). Baudino e colaboradores (2001) isolaram e caracterizaram dois membros da família *SERK*, os genes *ZmSERK1* e *ZmSERK2*, em milho, que se expressaram em culturas de calos embriogênicos e não-embriogênicos.

Outro gene descrito relacionado à embriogênese é o *Leafy Cotyledon 1* (*LEC1*), um importante fator de transcrição no controle da embriogênese zigótica, especialmente na maturação do embrião (Koehler, 2010). *LEC1* tem sido envolvido na regulação embriogênica durante o estágio inicial e tardio do desenvolvimento embrionário (Werner *et al.*, 2012). Embriões de *Arabidopsis*, mutantes de *LEC1* resultaram em defeitos na identidade do embrião e no processo de maturação (Meinke *et al.*, 1995) e apresentam características, tais como, ativação de meristemas apicais de parte aérea e raiz e a expressão de genes, que normalmente são expressos após a germinação. O gene *LEC1* codifica a subunidade HAP3 de fatores de transcrição de ligação CCAAT (Kwong *et al.*, 2003). A superexpressão do gene *LEC1* em *Arabidopsis* leva à embriogênese somática, sugerindo que *LEC1* é

extremamente responsável pela embriogênese somática em *mutantes pkl* e *clf swn* (Aichinger *et al.*, 2009).

O gene *Pickle* (*PKL*) codifica um fator de remodelação da cromatina que possui um domínio CHD3 (*chromodomain/helicase/DNA-binding domain*) necessária para a repressão da expressão de vários genes incluindo o *LEC1* (Ogas *et al.*, 1999). Rider e colaboradores (2003) sugeriram que o gene *PKL* regula seletivamente um conjunto de genes durante a germinação de *Arabidopsis* que reprimem a identidade embrionária. Além disso, o nível de transcrição de *PKL* em *Arabidopsis* aumentou durante a germinação (Henderson *et al.*, 2004). Em *Arabidopsis* portadores da mutação *pkl*, o meristema da raiz primária mantém características de tecido embrionário, ou seja, não reprimiu as características embrionárias após a germinação (Ogas *et al.*, 1997). Ainda assim, o *PKL* promove uma marca epigenética de trimetilação da histona 3 lisina 27 (H3K27me3) que facilita a repressão dos genes específicos de tecidos de plantas (Zhang *et al.*, 2012).

Já o gene *Curly Leaf* (*CLF*) é um membro da família de genes do grupo *polycomb*, com atividade na histona metiltransferase (Aichinger *et al.*, 2009). O gene *CLF* está envolvido da embriogênese e é necessário para a manutenção da repressão transcricional de genes homeóticos (Mayama *et al.*, 2003).

Os processos moleculares que governam a competência para a embriogênese em células vegetais ainda não estão totalmente esclarecidos. Estudos visando à expressão destes genes relacionados com o desenvolvimento da embriogênese, além de serem importantes para os estudos básicos de fisiologia, bioquímica e biologia molecular, são fundamentais para entender a sua relação com a regulação deste processo morfogenético em cana-de-açúcar. E possibilitarão a identificação de culturas com competência para embriogênese e o monitoramento do desenvolvimento adequado dos embriões somáticos nestas espécies de interesse científico e tecnológico.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Estudar os perfis de expressão de genes associados a determinação da competência embriogênica em culturas embriogênicas e não-embriogênicas de cana-de-açúcar.

2.2. Objetivos específicos

- ❖ Identificação *in silico* de sequências dos genes de interesse depositadas no Genbank e SUCEST, associados com o controle da embriogênese zigótica e somática em monocotiledôneas.

- ❖ Determinar o padrão de expressão gênica em culturas embriogênicas e não-embriogênicas, visando a compreensão dos genes no desenvolvimento embrionário e na determinação da competência embriogênica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

Foram utilizados toletes de cana-de-açúcar, cultivar SP 803280, cedidos pela UFRRJ /Campos (Campus Leonel Miranda) para gerar plantas utilizadas como material vegetal para indução das culturas embriogênicas. Os toletes foram separados e plantados em bandejas (Figura 3A). As bandejas contendo os toletes foram mantidas em temperatura e fotoperíodo ambiente, sendo regados diariamente com água pura até que as plantas atingissem, aproximadamente, 30 cm de altura (entre dois e três meses de cultivo) (Figura 3B).

3.2. Indução de calos

As plantas crescidas foram individualizadas, lavadas e foram retiradas as raízes e as folhas mais velhas (Figura 3C). Os cilindros centrais resultantes, contendo somente as folhas jovens, foram submetidos à desinfecção durante 1 minuto utilizando etanol 70% em seguida, foram lavados por 15 minutos em água sanitária comercial 40% e posteriormente lavados três vezes em capela de fluxo laminar com água destilada autoclavada por 5 minutos cada (Figura 3D). Então, o cilindro central foi seccionado longitudinalmente em discos de aproximadamente 3-4 mm, que foram usados como explantes. Os explantes foram inoculados individualmente em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com sacarose (20 g.L^{-1}), phytigel[®] (2 g.L^{-1}) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) ($10 \mu\text{M}$) (Figura 3E). O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8 e posteriormente autoclavados a 121°C por 15 min. Os tubos inoculados foram mantidos em estufa do tipo BOD no Laboratório de Biotecnologia LBT/CBB/UENF, a temperatura de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, no escuro, para indução dos CE e CNE.

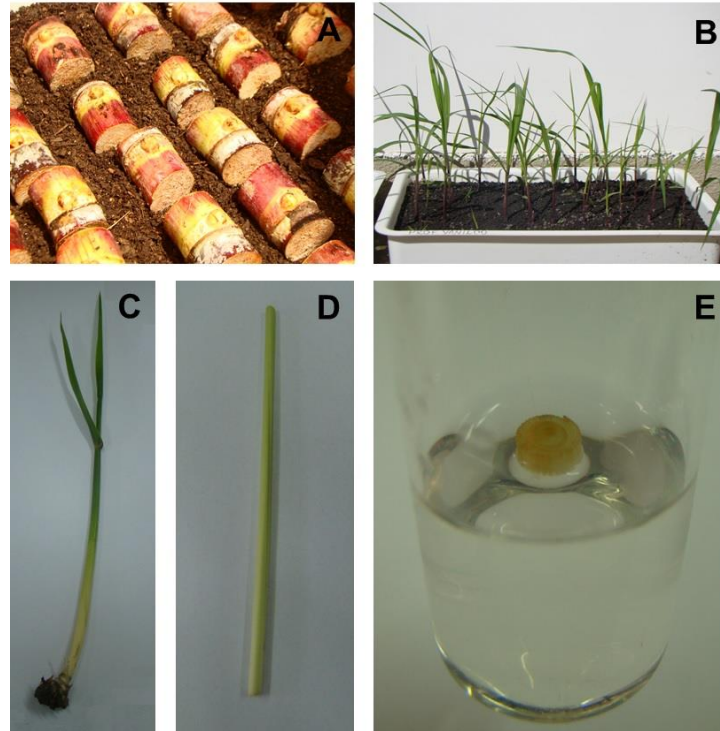


Figura 3. Esquema da obtenção dos explantes primários na regeneração de plantas via embriogênese somática em cana-de-açúcar. **A)** Toletes contendo as gemas para crescimento das plantas. **B)** Plantas com aproximadamente 30 cm de altura, crescidas em substrato comercial. **C)** Porção de interesse da planta. **D)** Porção medular (cilindro central) formada pelas folhas mais jovens. **E)** Secção transversal da porção medular utilizada como explante na indução de culturas.

Em paralelo, foram coletadas amostras dos cilindros centrais contendo as folhas jovens (Figura 4) e também do meristema apical das plantas (Figura 5), como controles, e congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente colocadas em freezer -80°C para posteriores análises.

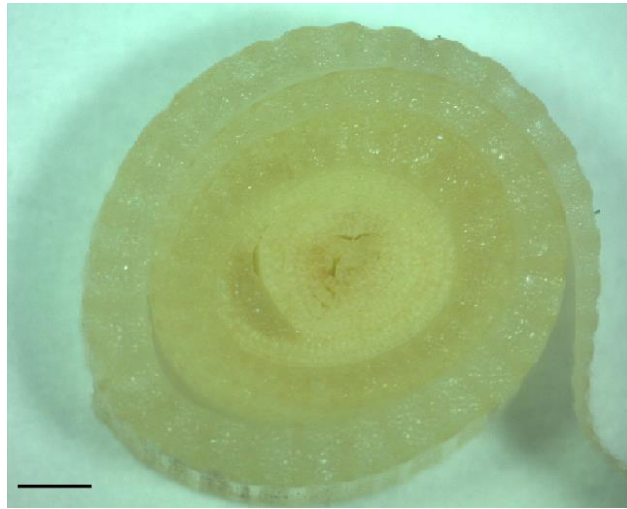


Figura 4. Cilindro central da cana-de-açúcar contendo folhas jovens. Escala (—): 0,5 mm.

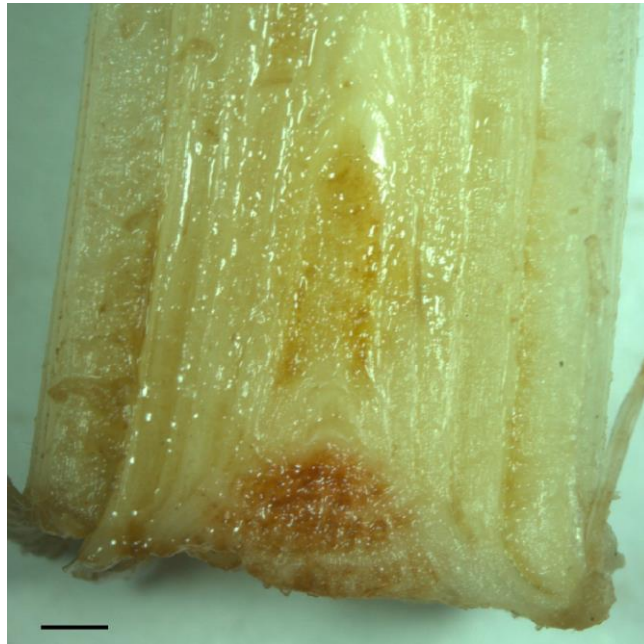


Figura 5. Corte longitudinal mostrando o meristema apical da cana-de-açúcar. Escala (—): 0,5 mm.

3.3. Manutenção e multiplicação das culturas embriogênicas e não-embriogênicas

Após o procedimento de indução, as culturas de cana-de-açúcar obtidas foram visualmente separadas em calos embriogênicos e não-embriogênicos em placas de petri distintas, foram utilizados 25 mL de meio de cultura MS suplementado com 2,4-D ($10 \mu\text{M}$), sacarose (20 g.L^{-1}) e phytigel® (2 g.L^{-1}),

mantidas em temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro, para o desenvolvimento de ciclos repetitivos de multiplicação celular.

Após aproximadamente 45-60 dias de indução, os calos induzidos foram transferidos para placas de petri, e após três subculturas foram separados visualmente em calos embriogênicos (CE) e calos não-embriogênicos (CNE) (Figura 6 A-B).

Para diferenciar os CE dos CNE foram visualmente analisados conforme descrito por Silveira *et al.* (2013). Os CE são caracterizados por apresentarem aspecto nodular opaco, facilmente destacável, maior atividade metabólica e com isso maior desenvolvimento, além de formarem plantas por embriogênese somática, enquanto que os CNE são mucilaginosos e translúcidos, possuem menor atividade metabólica, conseqüentemente crescem mais lentamente de forma desordenada e não formam plantas.

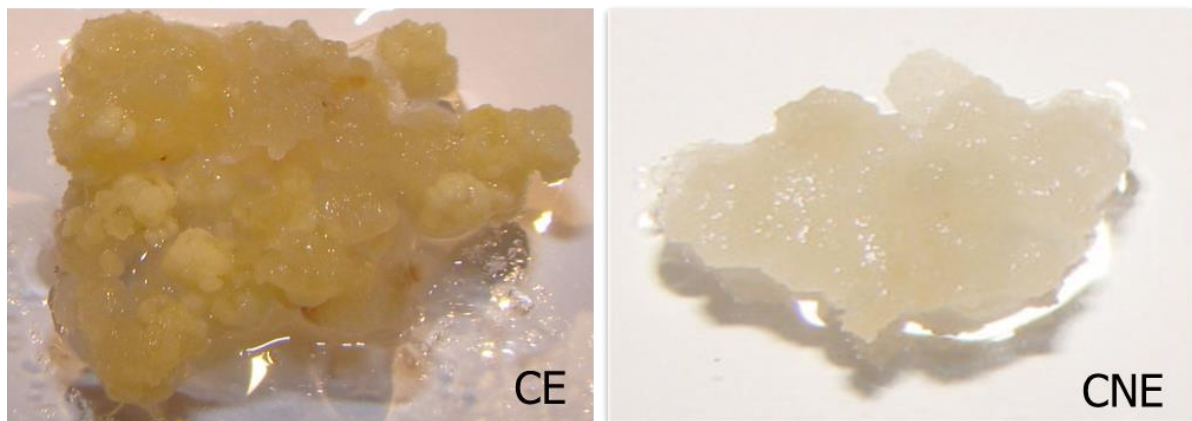


Figura 6. Aspectos morfológicos de calo embriogênico (CE) e calo não-embriogênico (CNE) de cana-de-açúcar.

Foram coletadas amostras no 14º dia de cultivo em multiplicação celular de cada tipo celular (CE e CNE), sendo essas congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente colocadas em freezer -80°C , para posteriores análises.

3.4. Maturação das culturas embriogênicas e não-embriogênicas

Após a fase de multiplicação celular, os calos serão submetidos à maturação. Foi utilizado o meio de cultura MS suplementado com sacarose (20 g.L^{-1}), phytigel® (2 g.L^{-1}) e CA ($1,5 \text{ g.L}^{-1}$). O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8 e

posteriormente autoclavados a 121°C por 15 min. As culturas foram mantidas em estufa do tipo BOD no Laboratório de Biotecnologia LBT/CBB/UENF, em temperatura de 25 ± 1°C, no claro. As amostras das culturas embriogênicas e não-embriogênicas do meio de maturação foram coletadas no 14º dia e congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente colocadas em freezer -80°C para posteriores análises.

3.5. Identificação *in silico* dos genes de interesse

A seleção de genes para avaliação foi realizada em função de informações prévias da literatura. Genes potencialmente associados com o desenvolvimento embriogênico, ou seja, na transição de uma célula somática em embriogênica, como *SERK 1*, *SERK 2*, *PKL*, *CLF* e *LEC1* foram escolhidos como genes candidatos.

Para a identificação de sequências gênicas homólogas em cana-de-açúcar foram realizadas buscas dirigidas pelo algoritmo BLAST de mRNAs de espécies já descritas no banco de dados do *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov) contra o Banco de Dados de Cana-de-açúcar SUCEST (sucest-fun.org).

Após a identificação das sequências dos diferentes genes em cana-de-açúcar e em espécies já descritas, foi realizado o pareamento destas pelo site *MultAlin* (multialin.toulouse.inra.fr), para identificação da homologia entre as sequências.

3.6. Construção dos *Primers*

Uma vez selecionadas as sequências que possuíam o domínio conservado dos genes, foi realizado o desenho dos *primers*, construídos através do software Generunner v.3.05 (Hastings Software Inc.). *Primers* correspondentes aos genes *housekeeping* (de expressão constitutiva) *GAPDH* (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) foram utilizados como controle interno.

Após o desenho dos *primers*, as sequências foram averiguadas utilizando o RepeatMasker (www.repeatmasker.org) para identificação de algum sobreposição das sequências utilizadas com elementos repetitivos do genoma (transposons, retrotransposons repetições simples entre outros) que poderia estar associado. Para maior especificidade dos *primers* foram estabelecidos parâmetros, tais como o

produto final entre 120 e 190 pares de bases e temperatura de pareamento dos *primers* a 60°C.

3.7. Extração de RNA dos calos embriogênicos e não-embriogênicos

A extração do RNA total dos calos embriogênicos e não-embriogênicos foram realizados utilizando Trizol reagente (Invitrogen®) segundo especificações do fabricante.

As amostras foram maceradas em almofariz contendo nitrogênio líquido até formar um aspecto pastoso e foi adicionado 1 mL de PBS (tampão fosfato-salino), posteriormente foi centrifugado a 12000 g por 10 min a 2-8°C. Foi acrescentado ao macerado 1 mL de reagente Trizol e homogeneizado, posteriormente a amostra foi incubada de 15°C a 30°C por 5 min, que permite a completa dissociação dos complexos nucleoprotéicos. Foram adicionados 200 µL de clorofórmio e os tubos foram agitados por 15 segundos e posteriormente incubados de 15 a 30°C por 2 a 3 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12000 g por 15 min a 2-8°C. Após a centrifugação, a mistura separa-se em uma fase inferior rosada (orgânica) de fenol-clorofórmio, uma interfase e uma fase aquosa superior incolor. O RNA permanece exclusivamente na fase aquosa superior incolor. A fase aquosa é transferida para um novo tubo. Foram adicionados 500 µL de álcool isopropílico, as amostras foram incubadas de 15°C a 30°C por 10 minutos e centrifugadas a 12000 g por 10 min a 2-8°C para precipitação do RNA total. A partir a precipitação do RNA, o sobrenadante é descartado, é adicionado 1 mL de etanol 75%. As amostras foram ressuspendidas por passagem em vortéx e centrifugadas a 7500 g por 5 min a 2-8°C. Após centrifugadas, o sobrenadante é descartado novamente e as amostras foram secadas durante 5 a 10 minutos a temperatura ambiente. Após a extração, o RNA foi colocado em freezer -80°C.

3.8. Quantificação do RNA

As amostras extraídas foram quantificadas utilizando o espectrômetro NanoDrop® 2000. A pureza do RNA foi verificada a partir da relação 260/280 nm. Quando a relação das densidades ópticas (260/280) se encontrava entre valores de

1.8 a 2.0, o material era considerado como tendo boa qualidade para uso. Foi colocado 1 μL da amostra no equipamento para a análise quantitativa.

3.8.1. Tratamento com DNase I

Subsequentemente, as amostras de RNA extraídas foram tratadas com a enzima Dnase I (Ambion®) para remoção de qualquer eventual resíduo de DNA proveniente da extração. As reações consistiram em 0,1 μL de *DNase I*, 1,0 de tampão Buffer Dnase I 10x, aproximadamente 900 ng da amostra e completa com água para um volume final de 10 μL . A reação foi incubada em termociclador a 37°C por 15 min. Foi introduzido 0,3 μL de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) em cada amostra, novamente incubada em termociclador a 75°C por 10 min, para inativação da enzima.

3.9. Transcrição Reversa (RT)

A transcrição reversa (RT) foi realizada através da utilização do HighCapacity RT Kit (Applied Biosystems®). Para cada etapa na qual foi manipulado RNA, este foi diluído em água tratada com DEPC (Dietil-pirocarbonato).

Para a realização do cDNA, foi feito um mix com 12,2 μL de água, 2,0 μL de Tampão Buffer RT, 0,8 μL de dntp, 2,0 μL de *Randon Primer*, 1,0 μL da enzima transcriptase reversa e 2,0 μL da amostra, num volume final de 20 μL . Foi incubado em termociclador em ciclos de 25°C por 10min, 37°C por 2 horas e 85°C por 5 segundos.

3.10. PCR (Reação em Cadeira de Polimerase)

Foi realizado um PCR para avaliação da qualidade do cDNA, utilizando-se um mix com 1,0 μL de tampão Buffer 10x, 5,85 μL de água, 0,15 μL de *primer 1 (forward)*, 0,15 μL de *primer 2 (reverse)*, 0,2 μL de dNTP, 0,6 μL de MgCl_2 (Cloreto de magnésio), 0,05 μL da enzima Amplitaq Gold. Foram colocados 8 μL do mix em cada tudo e posteriormente 2 μL de amostra, totalizando 10 μL por tubo.

A ciclagem do PCR foi de 10 min a 95°C, 50 ciclos de 95°C por 45 segundos; 60°C por 45 segundos; 72°C por 45 segundos; e um passo de extensão final a 72°C por 10 min.

3.11. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Os produtos da PCR foram separados eletroforeticamente em gel de poliacrilamida 8%. Os géis de poliacrilamida foram realizados a partir de 29% acrylamide plus 1% N,N methylenebisacrylamide (6,65 mL), H₂O (13,175 mL), TBE 5X (Tampão Tris-Borato-EDTA) (5 mL), persulfato de amônio (0,17 mL) e TEMED (Tetra-metil-etilenodiamina) (0,1 mL). Os géis foram polimerizados por aproximadamente vinte minutos. Após a polimerização, 3µL da amostra + 2µL de reagente Bradford foram aplicados no gel colocado na cuba contento o tampão de corrida Loading Buffer, com 30% glicerol e 0,25% azul de bromo fenol. A separação das bandas amplificadas ocorreu sob uma corrente de 100 V.

3.12. Coloração do gel de poliacrilamida

Após separação eletroforética, os géis foram corados com nitrato de prata. Os géis foram fixados em solução contendo 10 mL de etanol absoluto, 0,5 mL de ácido acético e 90 mL de água destilada por cinco minutos. Os géis foram corados com uma solução de nitrato de prata 0,2 g para 50 mL de água destilada por 10 minutos. E lavados com água após a coloração. Os géis foram revelados com uma solução de 3 g de hidróxido de sódio para 100 mL de água, e 1 mL de formol, até as bandas aparecerem nos géis. Os géis foram levados para digitalização da imagem.

3.13. PCR quantitativo (qPCR)

Para a análise quantitativa do padrão de expressão das amostras de tecido embriogênico e não-embriogênico foi feito PCR em tempo real conforme o protocolo de Hashimoto *et al.* (2007). As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems®) e o marcador fluorescente para DNA dupla fita, SYBR Green (Applied Biosystems®) para análise de genes específicos.

Os ensaios de qPCR foram realizados em um volume final de 10µl (5,0µl PCR Mastermix (SybrGreen) (AppliedBiosystem®); 2,7 µL água; 0,15 µL de cada *primer* (forward e reverse); 2,0 µL de cada amostra).

As condições de ciclagem foram: 95°C por 10 minutos, 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Toda distribuição das alíquotas de mix de qPCR e

das amostras de cDNA foram realizadas utilizando um micropipetador eletrônico monocanal da marca Gilson®. As curvas de dissociação foram obtidas seguindo os ciclos. Cada reação foi feita em duplicata. Os resultados da abundância de transcritos de cada gene foi obtida através da fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak e Schmittgen, 2001).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise *in silico* e construção dos *primers*

A partir de buscas na literatura de genes relacionados com a competência embriogênica, foi realizada uma pesquisa de genes candidatos ao trabalho, resultando em cinco genes, *PKL* (*pickle*), *CLF* (*Curly Leaf*), *LEC1* (*Leafy Cotyledon 1*), *SERK1*, *SERK2* (*Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 1 e 2*), relacionados com a embriogênese. Em algumas espécies já possuem ocorrência de caracterização inicial desses genes, como em *Arabidopsis*, milho, arroz e sorgo (Baudino *et al.*, 2001; Rider *et al.*, 2003; Ito *et al.*, 2005; Aichinger *et al.*, 2009; Junker e Baumlein, 2012). Porém, em cana-de-açúcar ainda não foi encontrado trabalhos relacionados à caracterização desses genes, sendo este um trabalho pioneiro para a espécie. Esses genes foram analisados *in silico*. Foram realizadas buscas pelo algoritmo BLAST a partir do acesso ao banco de dados na SUCEST de cana-de-açúcar (sucest-fun.org).

As sequências encontradas foram alinhadas com sequências de outras espécies já descritas no NCBI, a partir de um programa online *MultAlin* (Figuras 7, 8, 9, 10 e 11). O alinhamento permite identificar domínios de aminoácidos conservados, nas figuras 7, 8, 9, 10 e 11 em vermelho, a partir da sequência primária dos genes alinhados. Para isto, são utilizados programas de formação de Clusters de sequências (Corpet, 1988), os quais, a partir da estimativa de semelhança entre as sequências par a par, são alinhadas para formar os agrupamentos e identificar as regiões conservadas. A eficiência do alinhamento depende do grau de similaridade/identidade entre as sequências analisadas (Malone *et al.*, 2006).

O alinhamento para o gene *PKL* foi realizado a partir da sequência de *Arabidopsis* encontrada no NCBI e a sequência de cana-de-açúcar encontrada no banco de dados SUCEST, a partir do programa *online MultAlin*. As regiões conservadas foram observadas em vermelho, e em azul foram encontradas regiões não-conservadas entre as sequências (Figura 7).

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130
 Arabidopsis_Pkl | CAGATCCACACATTTCAAGAAATGAGTAGTTTGGTGGAGAGGCTCCGATACGATCTGATAGGAACCGTTTATACCTAGATGATCTGATGATGACGCTTCCTTCAAAAAGATCGAAGCT
 Cana_Pkl
 Consensus

131 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260
 Arabidopsis_Pkl | TTGAGCAGTGGAGCTATTGTCAGACTGATGCGAAGAAATGATGTGAGCTTGTGGGAAAGTACTATCTTGTAGCTGCATACATGCACCTATGCGTCCATGCTAAATGCTTAGTCCACC
 Cana_Pkl
 Consensus

261 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390
 Arabidopsis_Pkl | TCTTAAAGATGCTTCCGTAAGAAATGGAGATGCCGTGATGTGTAGTCTCTTACCGATAGATAGATATGGATTGTGAATGCTCTACAAATCTAGTGACAGGTTCTCCGATGCGGAA
 Cana_Pkl
 Consensus

391 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520
 Arabidopsis_Pkl | CCGAGCCCAATTTTGTGAACAGTATCTGTAAGTGGAGGGATATCATCTTCTGCTTGGTGGCTGAGAGGGAGTCCAGAGGCTTATAGTCAAAATCTGTTAAACACAGAGTGA
 Cana_Pkl
 Consensus

521 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620 630 640 650
 Arabidopsis_Pkl | ACAATTTTCCAGCTCAATGGAGTCTTCATACAGCGAGAGATGATTTGTTGCCATACGCTTCTGAGTGGACCCATGTTGATCGGATCTTGCCTGCAGAGAGGAGATGGGAGCTGGAAATCTTGT
 Cana_Pkl
 Consensus

651 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750 760 770 780
 Arabidopsis_Pkl | CAATATAGAGCTATCTATGATGATGTTATGGAGTCAGATCAGACATCTCACCTCCAGATGAATTCARAGGTCARAGGATGAATCTAGACTCCAGAGTAAAGATGTTGACCAT
 Cana_Pkl
 Consensus

781 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900 910
 Arabidopsis_Pkl | AAAGAAATCCAGAGCTTTCACAGTGTGATCATACTCTGAACTCTCAAGGCTGTTACATCCATACCAGCTTGGGGACTTAATTTTTCGGTCTCGTGGTCAAAACAGACGATGTAATCC
 Cana_Pkl
 Consensus

911 920 930 940 950 960 970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040
 Arabidopsis_Pkl | TTGCTGATGAATGGACTAGGCAAGCAATCAAGCATTGCCCTTTAGCTTCACTTTTGGAGAGACCTCATTCCGATTTGGTAAATGCTCCTATCGACTTGCCTAACGGAGAGAGTT
 Cana_Pkl
 Consensus

1041 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170
 Arabidopsis_Pkl | TGCCACATGGCCCCACAGATGACGTTGATGATTTGGCCTGCGCAGCTCGAGCAGTATCAGAGACATGAGTTTACTTATCGAAGATCAAAAAGATCAGAAAAGAAATCTGGACAA
 Cana_Pkl
 Consensus

1171 1180 1190 1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
 Arabidopsis_Pkl | ATAGTAGCGAAGCAGCAAAAAGATCAAGTTGATGCTCTCACATCGTATGAGATGATCAACCTAGATCAGCAGTCTAAACCAATTAAGTGGGAGTGCATGATGTTGATGAGGCTATC
 Cana_Pkl
 Consensus

1301 1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430
 Arabidopsis_Pkl | GACTGAARAATAGGATCAAGCTGTTCTTTCATTGACACAGTATCAGTACCCAGTATCTTCTGACAGGACACCCTTCAGACAACTTGGATGAATTTTCAATGCTCATGCAATTTCTTGA
 Cana_Pkl
 Consensus

1431 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540 1550 1560
 Arabidopsis_Pkl | TCGGGGAGTTTGGAGTTTGGAGGATCCAGAGGAGTCAAGATATATCAGAGGAGCAGATCTCAGGTTGCACAAATGTTGGCTCCACATTTGCTCAGAGGGTAAAAAAGAGCTAATG
 Cana_Pkl
 Consensus

1561 1570 1580 1590 1600 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690
 Arabidopsis_Pkl | AAAGACATGCCCCAAAAGGAGCTCAATTTGGCTGTTGATCTGAGCAGTCTCGAAGAAATATACAAAGCTATTTTACCCGTAATTAAGTATGCAAAAAGGGAGGCTCAAAATTTCC
 Cana_Pkl
 Consensus

1691 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800 1810 1820
 Arabidopsis_Pkl | TTATACATATGATGAAATACGAAAGATATGCTGCCATCTTATATGCTAGAGGGTGTGAGCCAGTATTCACGACGCAAAATGAGGCTTCAACAACTTTTGAGTCTGTGGAAGCTGCACCT
 Cana_Pkl
 Consensus

1821 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910 1920 1930 1940 1950
 Arabidopsis_Pkl | TCTAGATAAATGATGGTCAAACTGAAGAGCAGGACACAGAGTCTATATACACAGTTCACGATATGCTGGACTTACTTGAAGACTACTGTACCATAGAAATGGCACTACGAGCGAATTTGAT
 Cana_Pkl
 Consensus

1951 1960 1970 1980 1990 2000 2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080
 Arabidopsis_Pkl | GGAAGGTTGGCGAGCTGAGCGGCAATACCATAGATCGGTTCAATGCGCAAAATCTACAGTGTGTTTTCCTCCACAGAGCTGGTGGCTTGAATAAATCTTGCACAGCTGATACAG
 Cana_Pkl
 Consensus

2081 2090 2100 2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200 2210
 Arabidopsis_Pkl | TATCATTTATGACAGTACCTGGAACTCTCATGCTGATCTTCAGCAGTGGCTAGGCTCATCGACTTGGCCAAACAAATAGGATGATGATTTATAGGCTCATACCGAGGCACTTGAAGAGGAT
 Cana_Pkl
 Consensus

2211 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300 2310 2320 2330 2340
 Arabidopsis_Pkl | GATGCATGACTAAAGAAATGGTCTAGAGCATCTGTTGTTGGAACTCAAAA---CACAAACATTAATCAGGAGAGTATGATGACATCAGGATGATCAAGGAGCTTTTGTAGT
 Cana_Pkl
 Consensus

2341 2350 2360 2370 2380 2390 2400 2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470
 Arabidopsis_Pkl | GAAGATGATGAGCAGGAAAGTCTGGAAATTCATATGATGATCGGCTATAGCAATTTGCTGATCGTATCTCGTGGAGCAGAGGATCTCAGTGGATGATGAGAGGAAATGGATTTCTAA
 Cana_Pkl
 Consensus

2471 2480 2490 2500 2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600
 Arabidopsis_Pkl | AGGCTTCAGAGTGGCTAATTTGAATATATGATGAATGAGGACAGCATTAGAGGACAGAGGCTGCTGAAAG---CAAACTTCAGCAGGCAATCTGATAGAGCAGTATTGGGAGAG
 Cana_Pkl
 Consensus

2601 2610 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690 2700 2710 2720 2730
 Arabidopsis_Pkl | TTGTAAGAGATATTTGAGCTGCACAGGCTGAGGCTTATGCTTGGAAAGGAGAGAGCTCGCAGCAGTTGGTATCCATTGAAGAGATGATCTTCTGTTTGGAGATGAGGCTCTG
 Cana_Pkl
 Consensus

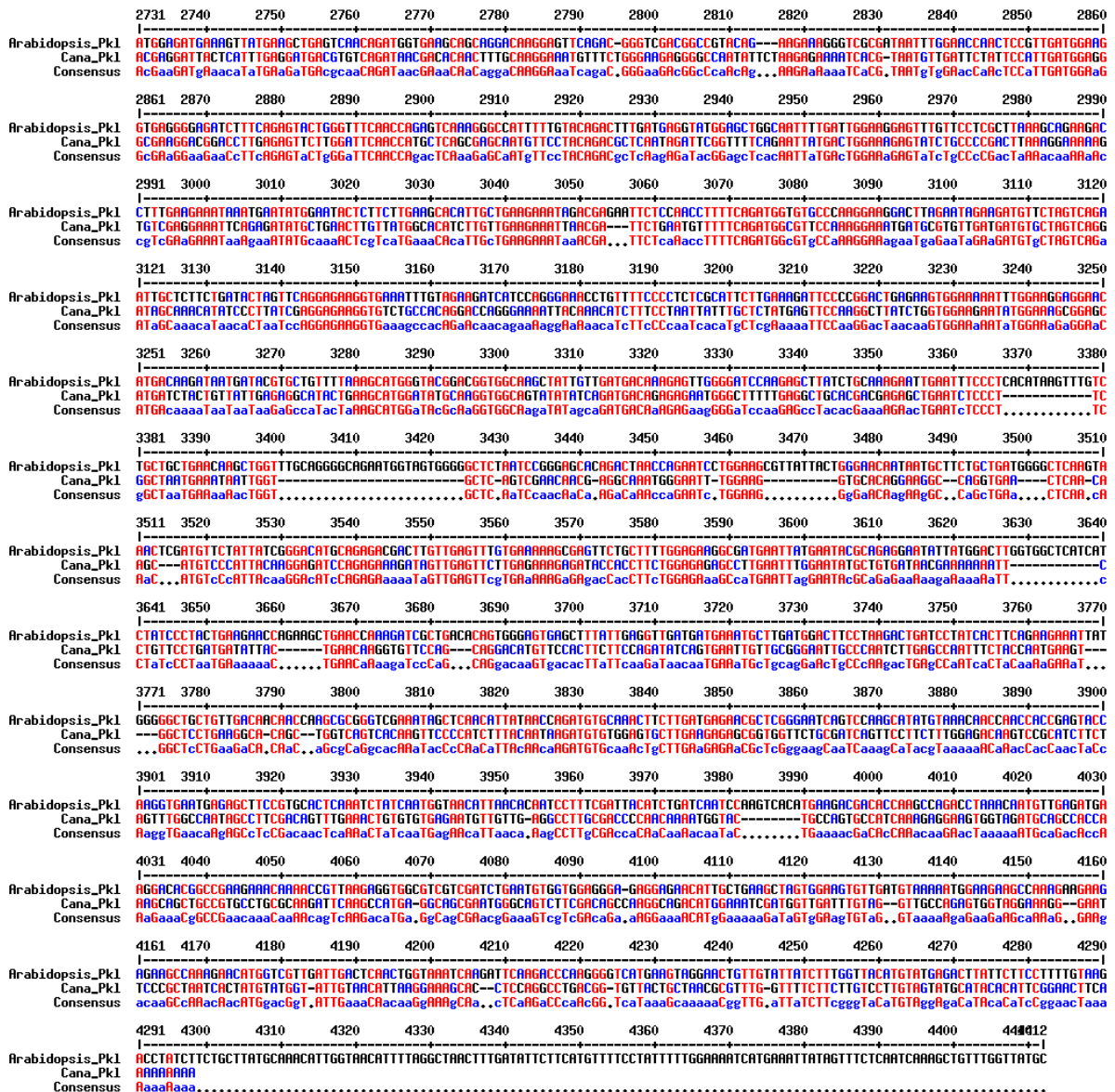


Figura 7. Alinhamento das sequências de *PKL* de *Arabidopsis* e cana-de-açúcar pelo programa *MultAlin*. Descrito em vermelho a similaridade e em azul a diferença entre as sequências.

O alinhamento para o gene *CLF* foi realizado a partir da sequência de *Arabidopsis* encontrada no NCBI e a sequência de cana-de-açúcar encontrada no banco de dados SUCEST, a partir do programa *online MultAlin*. As regiões conservadas foram observadas em vermelho, e em azul foram encontradas regiões não-conservadas entre as sequências (Figura 8).

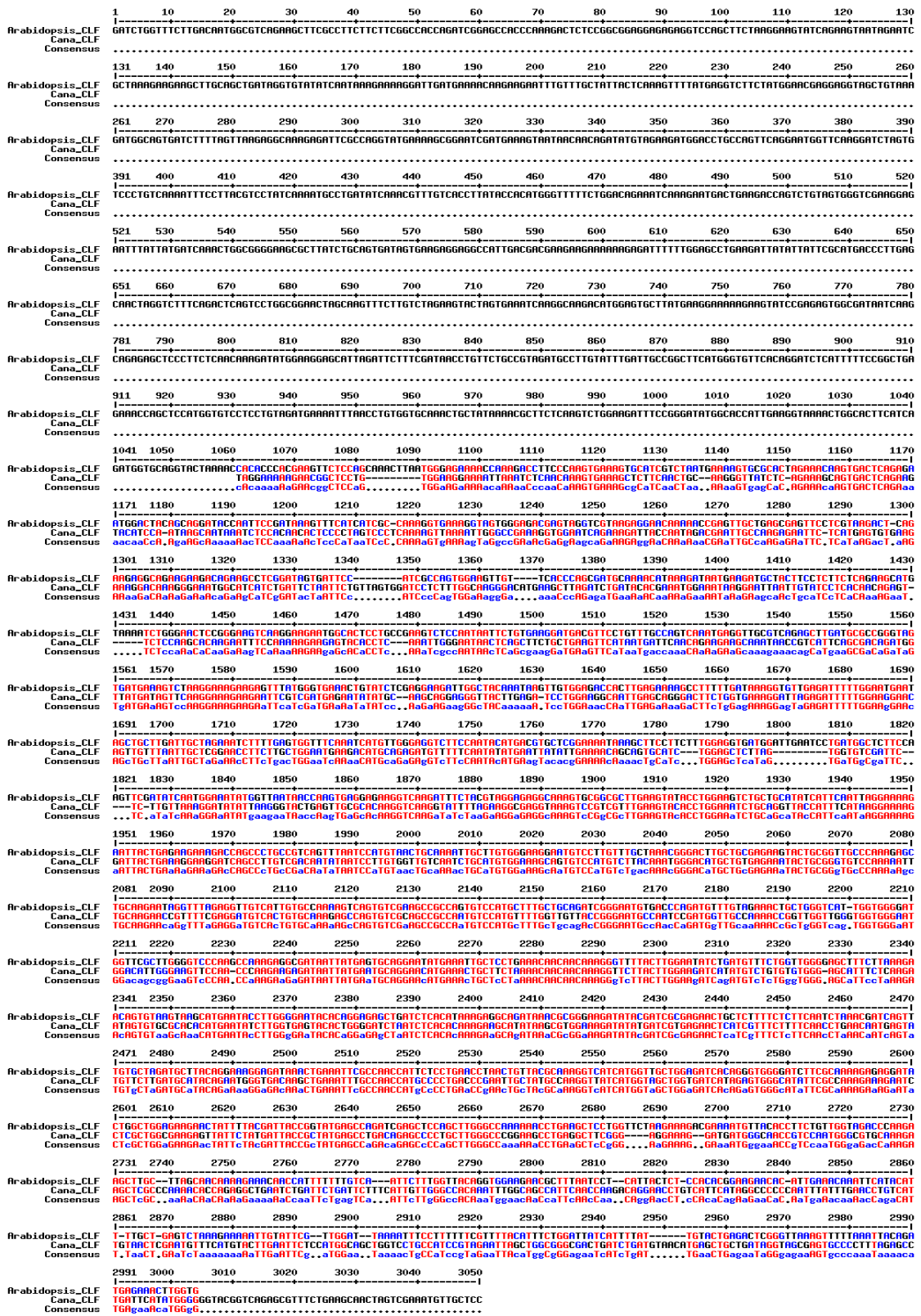


Figura 8. Alinhamento das seqüências de CLF de Arabidopsis e cana-de-açúcar pelo programa MultAlin. Descrito em vermelho a similaridade e em azul a diferença entre as seqüências.

O alinhamento para o gene *LEC1* foi realizado a partir da sequência de sorgo e milho encontrada no NCBI e a sequência de cana-de-açúcar encontrada no banco de dados SUCEST, a partir do programa *online MultAlin*. As regiões conservadas foram observadas em vermelho, e em azul foram encontradas regiões não-conservadas entre as sequências (Figura 9).

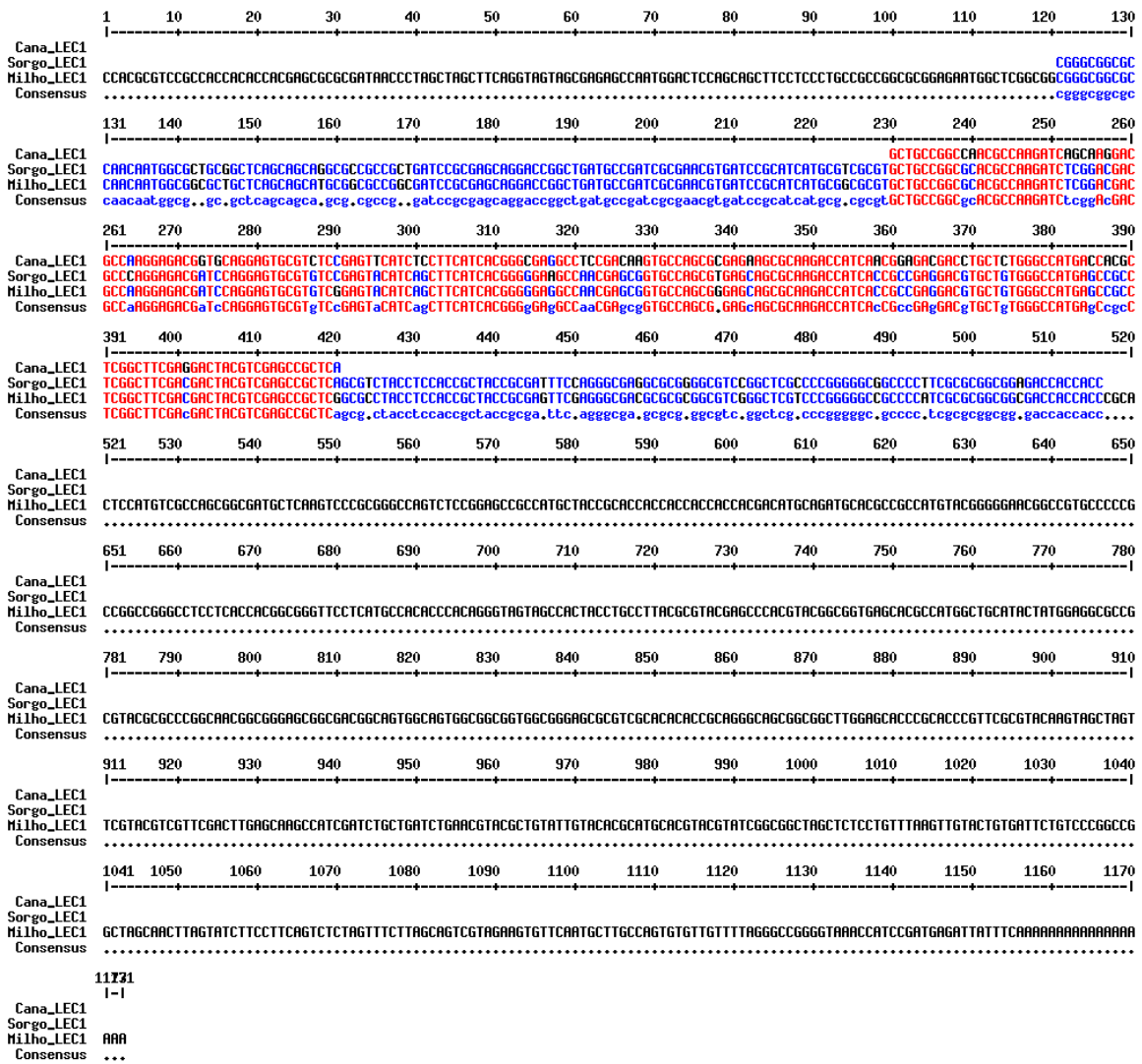


Figura 9. Alinhamento das sequências de *LEC1* de sorgo, milho e cana-de-açúcar pelo programa *MultAlin*. Descrito em vermelho a similaridade e em azul a diferença entre as sequências.

O alinhamento para o gene *SERK1* foi realizado a partir da sequência de milho encontrada no NCBI e a sequência de cana-de-açúcar encontrada no banco de dados SUCEST, a partir do programa *online MultAlin*. As regiões conservadas foram observadas em vermelho, e em azul foram encontradas regiões não-conservadas entre as sequências (Figura 10).

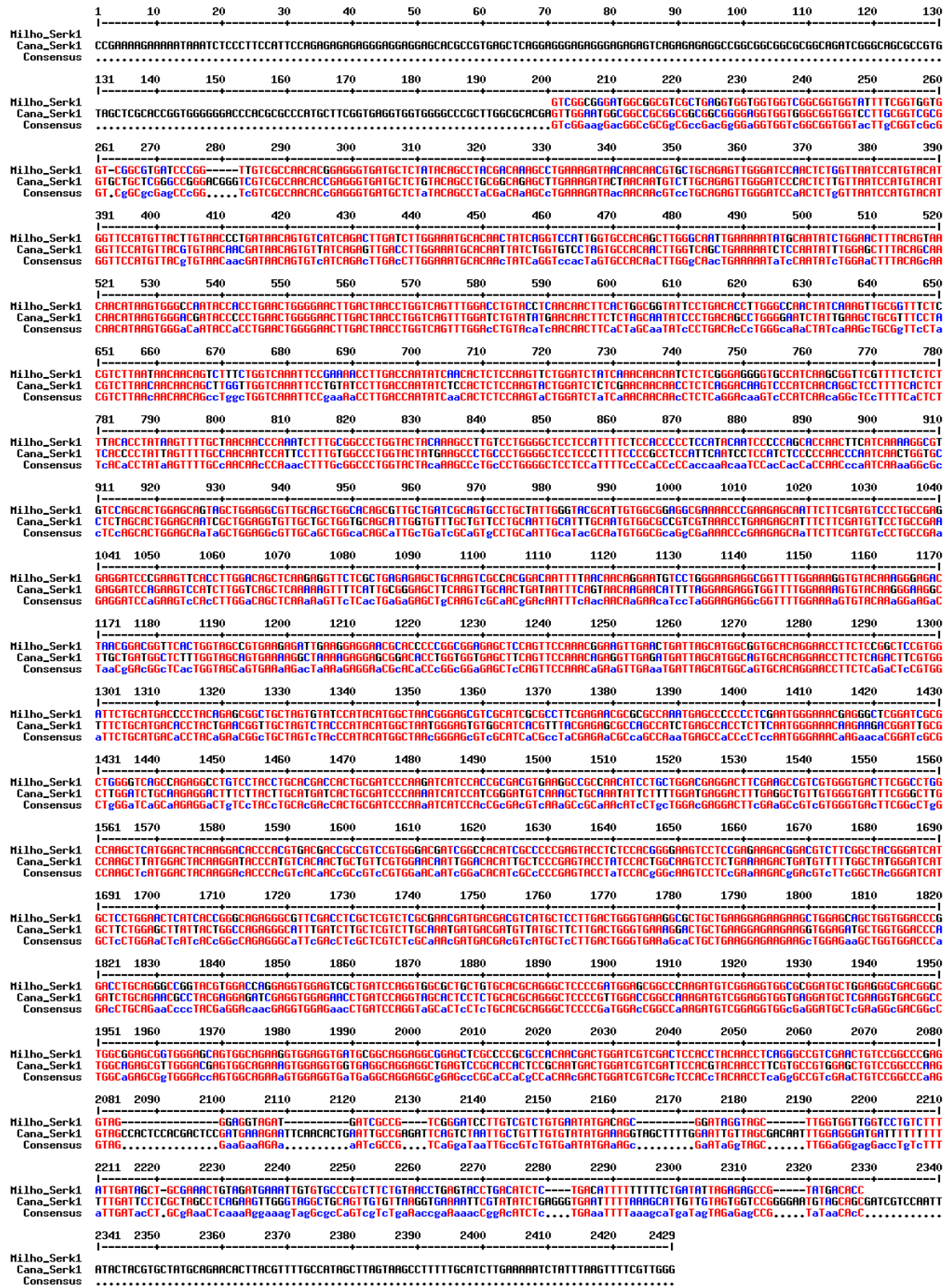


Figura 10. Alinhamento das sequências de *SERK1* de milho e cana-de-açúcar pelo programa *MultAlin*. Descrito em vermelho a similaridade e em azul a diferença entre as sequências.

O alinhamento para o gene *SERK2* foi realizado a partir da sequência de milho encontrada no NCBI e a sequência de cana-de-açúcar encontrada no banco de dados SUCST, a partir do programa *MultAlin*. As regiões conservadas foram observadas em vermelho, e em azul foram encontradas regiões não-conservadas entre as sequências (Figura 11).

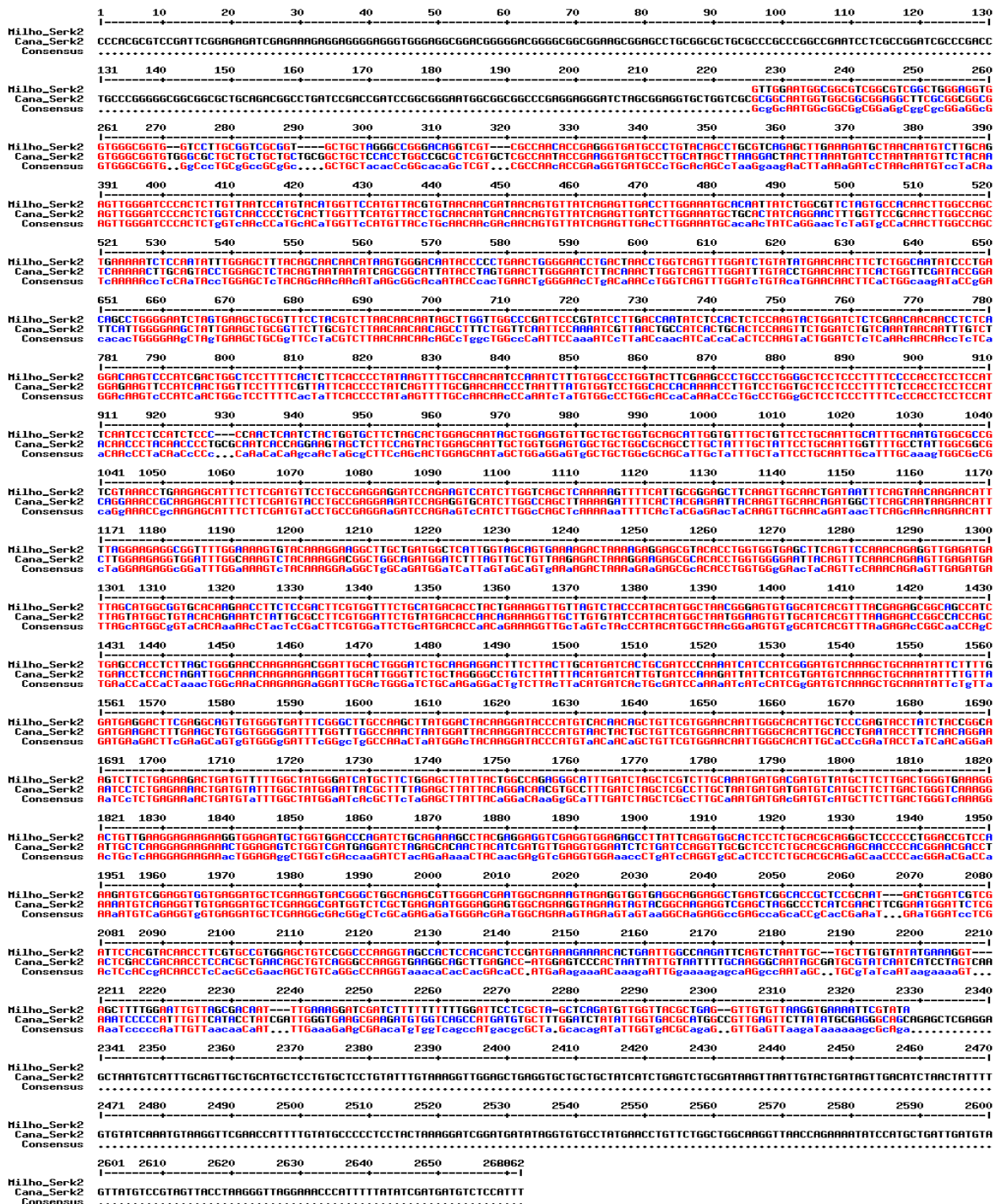


Figura 11. Alinhamento das sequências de *SERK2* de milho e cana-de-açúcar pelo programa *MultAlin*. Descrito em vermelho a similaridade e em azul a diferença entre as sequências.

As gramíneas apresentam grande variação no tamanho do genoma. Por outro lado, o mapeamento genético comparativo de arroz, milho, trigo, sorgo e outras gramíneas revelou extensa conservação do conteúdo de genes e ordem de genes em todas as espécies estudadas (Gale e Devos, 1998). Estes estudos forneceram uma base para a compreensão da evolução do genoma e levaram ao isolamento mapas genéticos baseados no interesse agrônômico (Ma *et al.*, 2005).

Devido à alta poliploidia da cana-de-açúcar e ausência de parentes diploides próximos, a vantagem de investigar a sintenia com outras Poaceae tem sido explorada. O conhecimento do genoma da cana-de-açúcar potencialmente também beneficia programas de estudos de genomas de outros cereais, especialmente arroz, sorgo e milho (Asnaghi *et al.*, 2000).

A comparação entre a sequência de cana e sorgo revelou alta colinearidade e alta conservação de estrutura do gene e similaridade de nucleotídeos. O sorgo foi encontrado para ser a espécie estudada com relação de mais sintenia com cana-de-açúcar, sugerindo que o sorgo é uma espécie modelo de escolha para a cana-de-açúcar (Jannoo *et al.*, 2007). Arroz também apresentou uma relativa sintenia global com a cana-de-açúcar, no entanto, com muitos rearranjos, explicados pela larga distância entre as duas espécies (Glaszmann *et al.* 1997).

Após encontrar os genes de interesse e seus homólogos, as regiões conservadas foram identificadas a partir do alinhamento das sequências para posterior construção dos *primers*. Foram escolhidas sequências de 120 a 200 nucleotídeos, em regiões bem conservadas para a construção dos *primers*. (Figura 12, 13,14,15,16).

Posteriormente, foi realizado a construção dos *primers* pelo software GeneRunner v.3.05 (Tabela 1). Foram escolhidas sequências de 18 a 21 bases nucleotídicas sem complementariedade (dímeros), com temperatura de pareamento de 60°C. Todos os *primers* dos genes utilizados foram projetados para regiões conservadas com base na comparação das sequências de espécies já descritas e cana-de-açúcar.

Tabela 1. Sequência dos *primers* utilizados para quantificação da expressão gênica através dos ensaios de Real Time PCR. As sequências estão representadas na direção 5' → 3' F: *forward* (sense); R: *reverse* (anti-sense).

Gene	Primers (5' → 3')
<i>PKL</i>	F: 5' TCAGCGAGCAATGTTCCAC 3' R: 5' GGAACGCCATCTGAAAAACAT 3'
<i>CLF</i>	F: 5' GGATTAGAGATTTTTGGAAGGA 3' R: 5' AAAATACCTTGACCTTGTGCG 3'
<i>LEC1</i>	F: 5' AGTTCATCTCCTTCATCACGG 3' R: 5' GACGTAGTCCTCGAAGCCG 3'
<i>SERK1</i>	F: 5' CTTTCACTCTTCACCCCTAT 3' R: 5' ACCAGCAGCAACACCTCCA 3'
<i>SERK2</i>	F: 5' TTTCTCCACCTCCTCCATAC 3' R: 5' TGCTCTTGCGGTTTCCTGC 3'
<i>GAPDH</i>	F: 5' CACGGCCACTGGAAGCA 3' R: 5' TCCTCAGGGTTCCTGATGCC 3'

A etapa de construção dos *primers* e adaptação da PCR são etapas chaves do sucesso da análise da expressão gênica. O desenho de *primers* é dividido em quatro fases: busca e escolha das sequências de interesse; alinhamento das sequências e determinação do consenso; seleção da região consenso mais conservada e escolha e teste dos *primers* (Leon *et al.*, 2009).

Existem recomendações específicas para a construção de *primers*, como as relatadas por Lisby (1999) e Garcês e Lima (2004), como: a) estabelecer o tamanho dos *primers* entre 18 e 24 bases para minimizar o risco de anelamentos inespecíficos; b) assegurar relação entre bases purinas e pirimidinas entre 40 e 60% para a maximização da especificidade da reação, evitando uma concentração de bases G/C inferior a 50%, de forma a não prejudicar o cálculo da temperatura de anelamento; c) evitar trincas de bases repetidas; d) evitar complementariedade inter e intramolecular, principalmente na extremidade 3' para impedir formação de estruturas secundárias como a ocorrência de dímeros; e) construir um arranjo de bases que permita uma temperatura de anelamento entre 58°C e 62°C, sendo crucial que as temperaturas de anelamento dos dois *primers* sejam próximas.

Como resultado, todos os pares de *primers* obtidos mostraram um elevado grau de conservação entre as sequências de cana-de-açúcar e *Arabidopsis*, milho ou sorgo. Assim como, Iskandar e colaboradores (2004) mostraram que os *primers*

projetados para os genes β -actina e β -tubulina mostraram um alto grau de conservação entre as sequências de cana-de-açúcar e arroz e/ou milho, e deve ser utilidade direta em outras monocotiledôneas homólogas.

O *primer forward* do gene *PKL*, com 20 bases, foi selecionado como um *primer forward*, gênero-específico, em uma região conservada localizada na posição 2901-2920 na sequência do gene *PKL*. O *primer reverse* genérico do gene *PKL*, com 21 bases, foi selecionado em uma região conservada localizada na posição 3063-3083 na sequência do gene *PKL*. O tamanho do fragmento (*amplicon*) foi de 180 bases nucleotídicas (Figura 12).

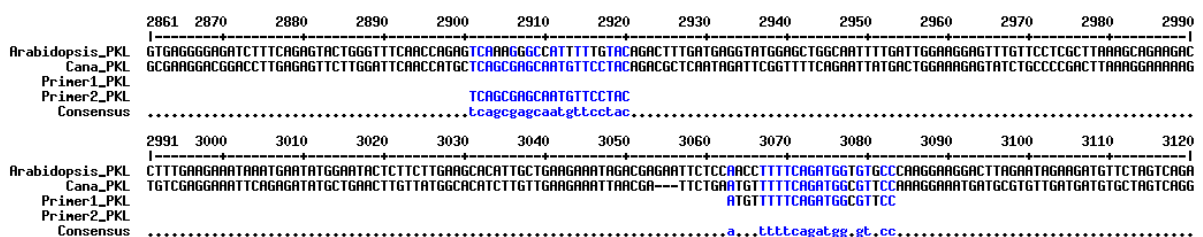


Figura 12. Sequência dos *primers* do gene *PKL* de cana-de-açúcar alinhados a sequência de seu respectivo *amplicon* e demais sequências homólogas.

O *primer forward* do gene *CLF*, com 22 bases, foi selecionado como um *primer forward*, gênero-específico, em uma região conservada localizada na posição 1667-1688 na sequência do gene *CLF*. O *primer reverse* genérico do gene *CLF*, com 21 bases, foi selecionado em uma região conservada localizada na posição 1859-1879 na sequência do gene *CLF*. O tamanho do fragmento (*amplicon*) foi de 195 bases nucleotídicas (Figura 13).

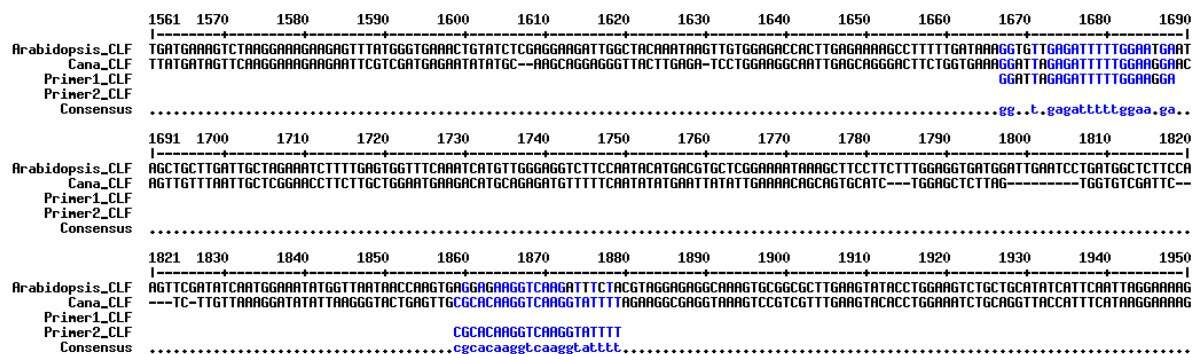


Figura 13. Sequência dos *primers* do gene *CLF* de cana-de-açúcar alinhados a sequência de seu respectivo *amplicon* e demais sequências homólogas.

O *primer forward* do gene *LEC1*, com 21 bases, foi selecionado como um *primer forward*, gênero-específico, em uma região conservada localizada na posição 292-312 na sequência do gene *LEC1*. O *primer reverse* genérico do gene *LEC1*, com 19 bases, foi selecionado em uma região conservada localizada na posição 392-410 na sequência do gene *LEC1*. O tamanho do fragmento (*amplicon*) foi de 118 bases nucleotídicas (Figura 14).

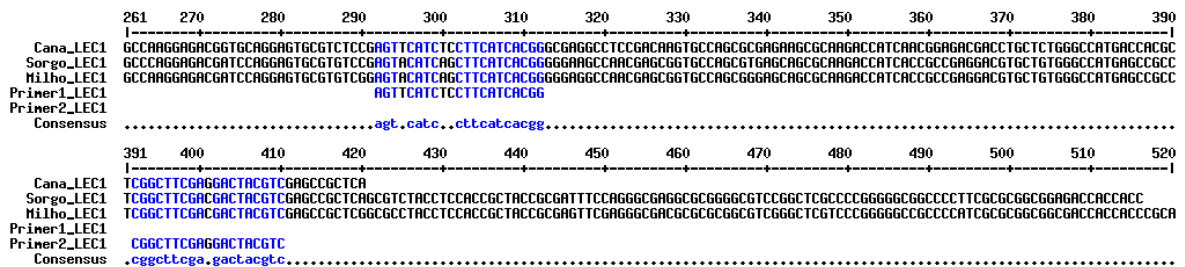


Figura 14. Sequência dos *primers* do gene *LEC1* de cana-de-açúcar alinhados a sequência de seu respectivo *amplicon* e demais sequências homólogas.

O *primer forward* do gene *SERK1*, com 21 bases, foi selecionado como um *primer forward*, gênero-específico, em uma região conservada localizada na posição 770-790 na sequência do gene *SERK1*. O *primer reverse* genérico do gene *SERK1*, com 19 bases, foi selecionado em uma região conservada localizada na posição 932-950 na sequência do gene *SERK1*. O tamanho do fragmento (*amplicon*) foi de 181 bases nucleotídicas (Figura 15).

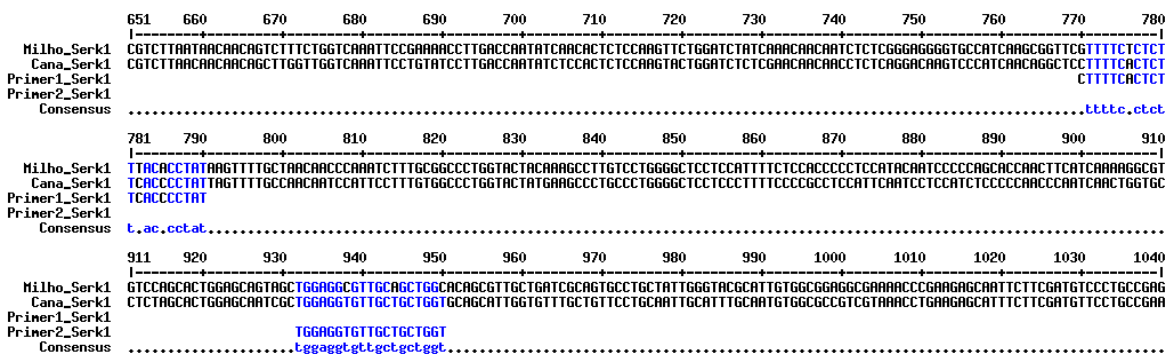


Figura 15. Sequência dos *primers* do gene *SERK1* de cana-de-açúcar alinhados a sequência de seu respectivo *amplicon* e demais sequências homólogas.

O *primer forward* do gene *SERK2*, com 20 bases, foi selecionado como um *primer forward*, gênero-específico, em uma região conservada localizada na posição

893-912 na sequência do gene *SERK2*. O *primer reverse* genérico do gene *SERK2*, com 19 bases, foi selecionado em uma região conservada localizada na posição 1040-1058 na sequência do gene *SERK2*. O tamanho do fragmento (*amplicon*) foi de 166 bases nucleotídicas (Figura 16).

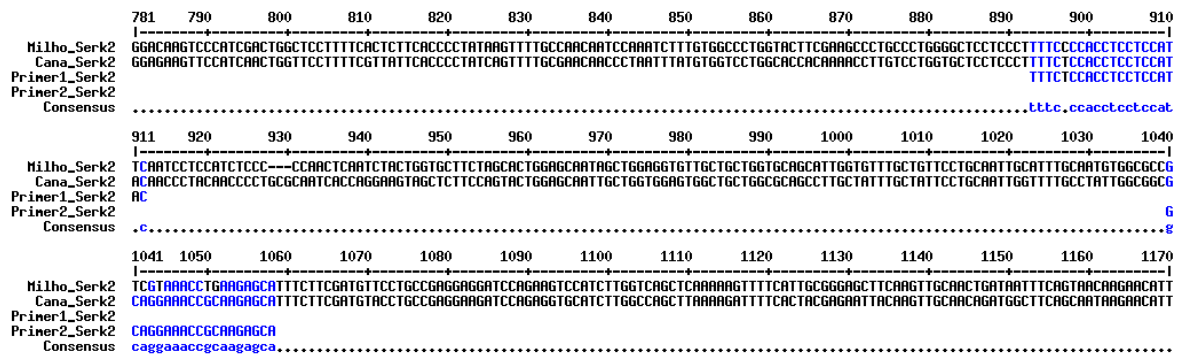


Figura 16. Sequência dos *primers* do gene *SERK2* de cana-de-açúcar alinhados a sequência de seu respectivo *amplicon* e demais sequências homólogas.

Para averiguar a presença de cDNA puro (não contaminado com DNA genômico) foi realizado uma PCR utilizando *primers* para o gene *GAPDH* de cana-de-açúcar ancorados em uma distribuição exon-intron-exon dentro da sequência do gene em questão. Ambas as figuras (17 e 18) ilustram eletroforeses em gel de poliacrilamida 12% corado com nitrato de prata 0,1 % w/v. Os resultados dos géis para controle positivo (Fig 17 e 18) e negativo (Fig 19) demonstram a amplificação de transcritos de *GAPDH* e ausência de amplificação no controle negativo. Esses resultados demonstram que a transcrição reversa e a eliminação de possíveis contaminantes pela ação da *DNAse I* foram bem sucedidas.

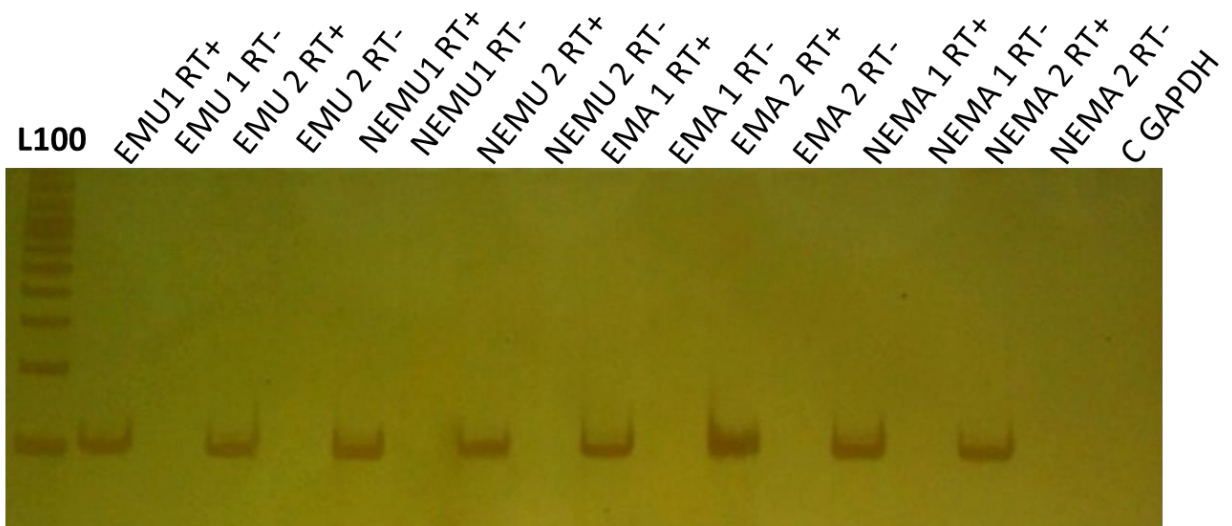


Figura 17. Gel de eletroforese das amostras de calos embriogênico (CE), não-embriogênico (CNE) com os transcritos de *GAPDH*. L100 – Marcador de peso molecular de 100 pares de base. RT+: Controle positivo; RT-: controle negativo. Emu1: Embriogênico, multiplicação1; Emu2: Embriogênico, multiplicação2; Nemu1: Não-embriogênico, multiplicação1; Nemu2: Não-embriogênico, multiplicação2; Ema1: Embriogênico, maturação1; Ema2: Embriogênico, maturação2; Nema1: Não-embriogênico, maturação1; Nema2: Não-embriogênico, maturação2.

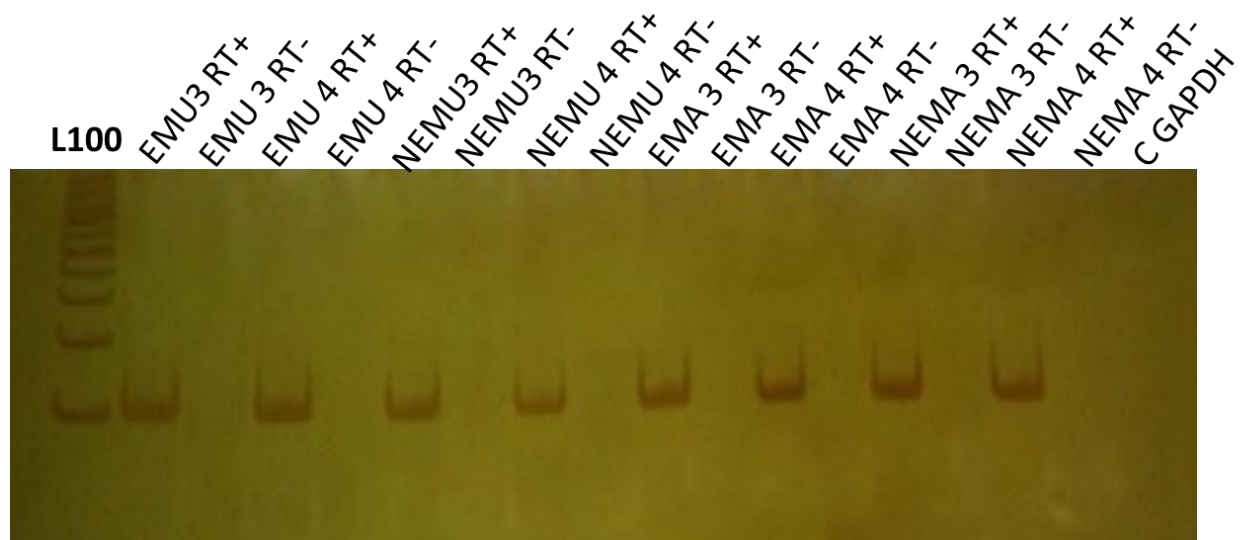


Figura 18. Gel de eletroforese das amostras de calos embriogênico (CE), não-embriogênico (CNE) com os transcritos de *GAPDH*. L100 – Marcador de peso molecular de 100 pares de base. RT+: Controle positivo; RT-: controle negativo. Emu3: Embriogênico, multiplicação3; Emu4: Embriogênico, multiplicação4; Nemu3: Não-embriogênico, multiplicação3; Nemu4: Não-embriogênico, multiplicação4; Ema3: Embriogênico, maturação3; Ema4: Embriogênico, maturação4; Nema3: Não-embriogênico, maturação3; Nema4: Não-embriogênico, maturação4.

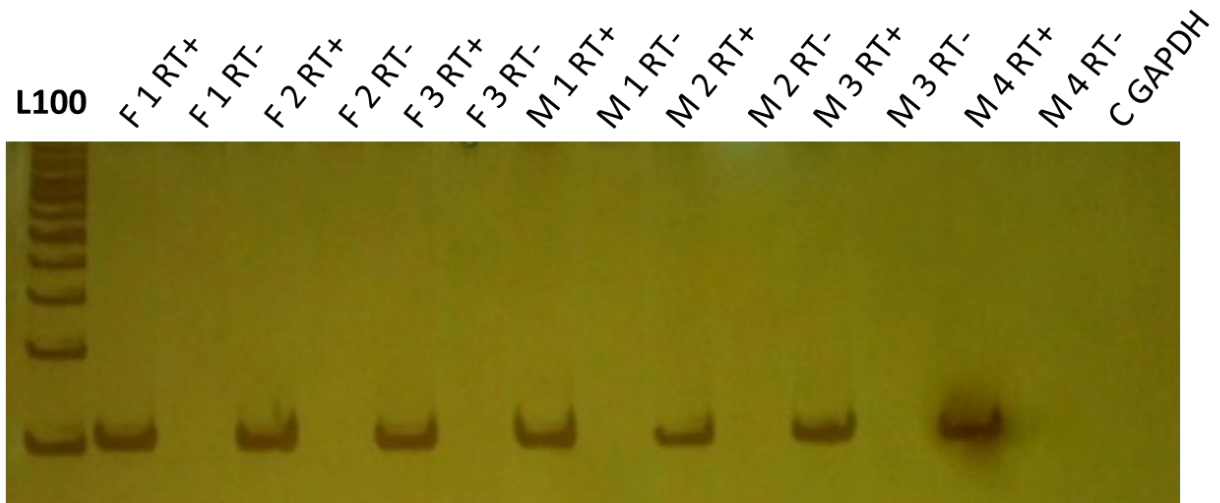


Figura 19. Gel de eletroforese das amostras de folha e meristema (controles) com os transcritos de *GAPDH*. L100 – Marcador de peso molecular de 100 pares de base. RT+: Controle positivo; RT-: controle negativo. F: Folha; M: Meristema.

4.2. Análise da abundância de transcritos ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) através de análise dos resultados de PCR quantitativo (qPCR)

Estudos em diferentes modelos de eucariotos demonstram que essa transição entre um estado de diferenciação celular para um estado de totipotência constitui uma reprogramação no transcriptoma e no epigenoma celular (Duranthon *et al.*, 2008). Nesta reprogramação celular que ocorre durante a indução da embriogênese somática uma célula somática diferenciada necessita se desdiferenciar e ativar o seu ciclo de divisão celular por meio de alterações fisiológicas, metabólicas e dos padrões de expressão gênica (Fehér *et al.*, 2003; Verdeil *et al.*, 2007).

Em mamíferos onde a reprogramação genômica começou a ser estudada a mais de meio século, com experimentos de Briggs e King (1952), atualmente se conhece as assinaturas de expressão que levam ao estabelecimento de toti e pluripotência, sendo essas utilizadas para gerar células indiferenciadas como as iPS (*induced pluripotent stem cells*) (Hochedlinger e Plath, 2009). Os perfis de expressão gênica relacionados com a embriogênese sofrem mudanças drásticas durante o desenvolvimento do embrião e na diferenciação dos diferentes tecidos, sendo estes perfis regulados de forma tempo e espaço específico. Para elucidar esse

mecanismo, é necessário caracterizar os perfis de expressão gênica adjacente aos processos de embriogênese e diferenciação celular. (Shibukawa *et al.*, 2009).

Estudos em diferentes modelos de eucariotos têm demonstrado que a transição entre estados de potencialidade celular são mediados principalmente por genes codificadores de fatores de transcrição (*TF – Transcription Factors*) e genes codificadores de fatores de remodelamento da cromatina (Yazawa *et al.*, 2004) e Hanna *et al.*, 2010).

O gene *PKL (ATP-dependent chromatin remodeler PICKLE containing CHD3 domain)* teve sua atividade está associada à repressão de genes associados ao estabelecimento de traços embriogênicos e dessa forma, a promoção do estabelecimento de identidade celular durante a diferenciação (Zhang *et al.*, 2012).

Os resultados da análise dos transcritos mostra um perfil de aumento de transcritos de *PKL* nas amostras de folhas (células diferenciadas) versus meristema (células não-diferenciadas), porém com uma pequena variação de uma repetição para outra, como em folhas, F1 possui 1,985284 e F3 possui 1,600046 de quantidade de transcritos. No meristema, M1 tem 1,278913 e M3 possui 0,94198 de quantidade de transcritos. Ocorre também uma grande variabilidade da quantidade de transcritos em cada repetição de cada tratamento (Figura 20).

A cultura de tecidos pode induzir variação em plantas regeneradas, que é chamada variação somaclonal (Larkin e Snowcroft, 1981), que podem resultar numa gama de variações geneticamente estáveis (Skirvin *et al.*, 1993; Jain *et al.*, 1998). A variação somaclonal imprevisível na natureza pode ser tanto de origem hereditária (genéticos) como não hereditária (epigenética) (Jain, 2001).

O sistema de cultura de tecido atua como um sistema que causa diversos tipos de estresse as plantas, pois as células experimentam experiências traumáticas de isolamento, e podem reprogramar-se durante a regeneração da planta, que são diferentes do que em condições naturais. A reprogramação ou reestruturação de eventos pode criar uma ampla gama de variação epigenética em plantas recém-regeneradas (Jain, 2000).

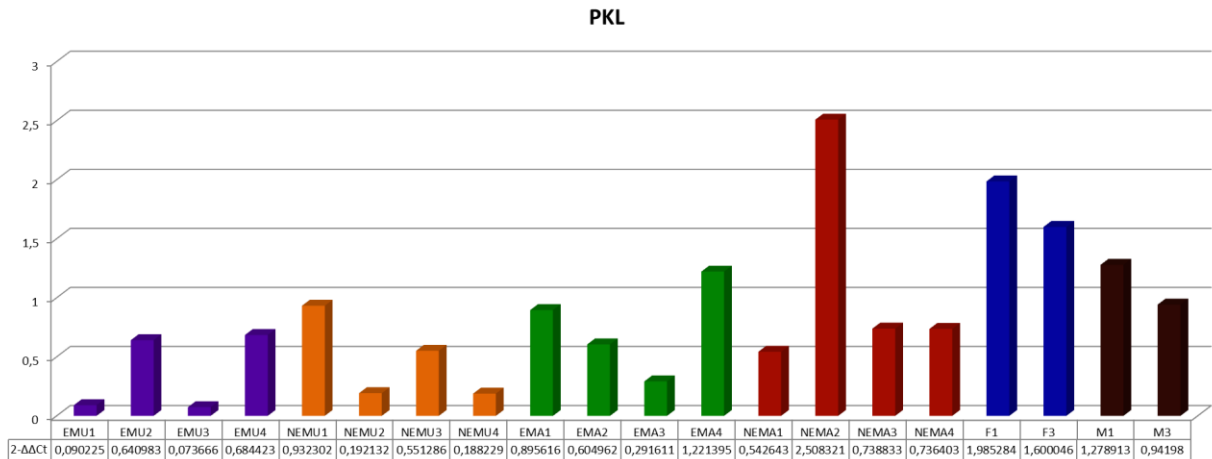


Figura 20. Resultado dos valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para o gene *PKL* nos calos embriogênicos e não-embriogênicos durante a multiplicação e maturação, folhas e meristema. Emu (roxo): embriogênico, multiplicação; Nemu (laranja): Não-embriogênico, multiplicação; Ema (verde): Embriogênico, maturação; Nema (vermelho): Não-embriogênico, maturação; F (azul): Folha; M (preto): meristema. Quatro repetições por tratamento.

Os resultados da análise da média de transcritos mostram um perfil de aumento de transcritos de *PKL* em amostras durante a maturação *versus* amostras durante a multiplicação, nos CE, EMA teve um aumento de 50,58% em relação ao EMU, nos CNE, NEMA teve um aumento de 58,82% em relação a NEMU. O perfil de abundância de transcritos em amostras *in vivo* demonstra uma expressão aumentada nas amostras de folhas (células diferenciadas) de 38,06% em relação ao meristema (células não-diferenciadas) (Figura 21). De acordo com a literatura, o gene *PKL* reprime a embriogênese e inicia o desenvolvimento para o crescimento vegetativo em *Arabidopsis* (Rider *et al.*, 2003).

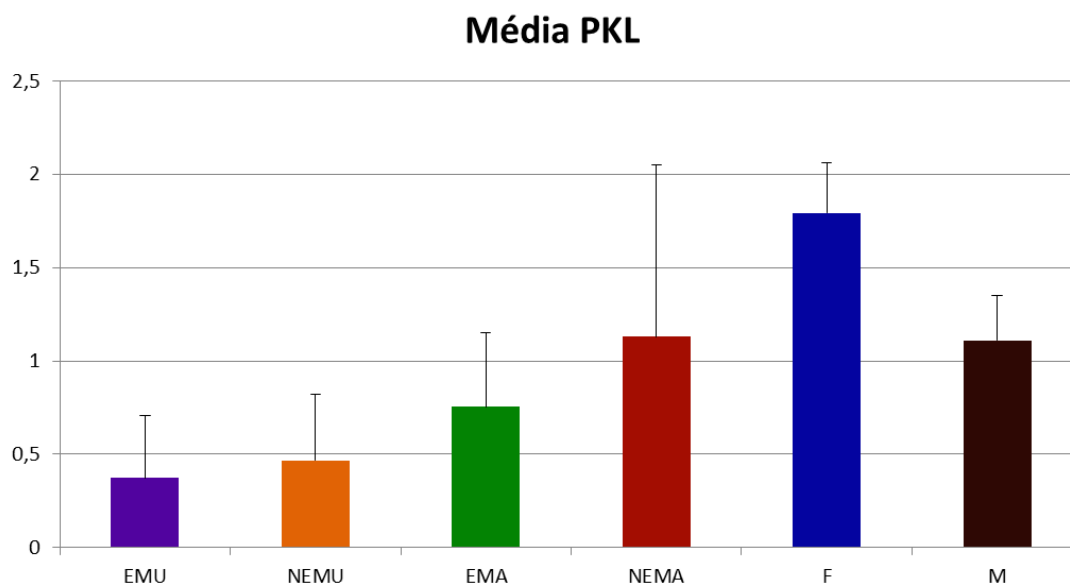


Figura 21. Resultado da média dos valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para o gene *PKL* nos calos embriogênicos e não-embriogênicos durante a multiplicação e maturação, folhas e meristema. Emu (roxo): embriogênico, multiplicação; Nemu (laranja): Não-embriogênico, multiplicação; Ema (verde): Embriogênico, maturação; Nema (vermelho): Não-embriogênico, maturação; F (azul): Folha; M (preto): meristema. Dados representam médias de 4 repetições \pm EP.

O fator de transcrição *LEAFY COTYLEDON1 (LEC1)* fator de ligação ao motivo CCAAT expresso na embriogênese inicial (Junker e Baumlein, 2012). Muitos fatores de transcrição demonstraram ter envolvimento em diversos eventos de desenvolvimento e/ou respondem a estímulos ambientais, mediante a variação da sua expressão espaço/temporal e sua interação com outros fatores de transcrição (Junker e Baumlein, 2012). A expressão de *LEC1* é restrita à embriogênese e é reprimida na fase pós-germinação do tecido vegetativo em parte pela *PKL* (Ogas *et al.*, 1999). *LEC1* é negativamente regulada por *PKL* durante o desenvolvimento (Ogas *et al.*, 1999). Portanto, a repressão da expressão de *LEC1* é uma característica de transição da embriogênese para o crescimento vegetativo (Casson e Lindsey, 2006).

Os resultados da análise dos transcritos mostra um perfil de aumento de transcritos de *LEC1* nas amostras de folhas (células diferenciadas) versus meristema (células não-diferenciadas), porém com uma grande variabilidade de transcritos em F, de 8,888626 para F1 e 0,725455 para F3. Para os calos

embriogênicos em maturação (EMA), a abundância de transcritos foi maior que para os outros tratamentos, isto corrobora com a literatura, demonstra que o *LEC1* é reprimido após a germinação, indicando que o *LEC1* é essencial para o desenvolvimento inicial (Ogas *et al.*, 1999). Porém, ocorre uma grande variabilidade da quantidade de transcritos em EMA, que tem de 1,503148 a 15,03564 de quantidade de transcritos, em EMA2 e EMA4, respectivamente. Essa variação de transcritos também ocorre nos demais tratamentos (Figura 22).

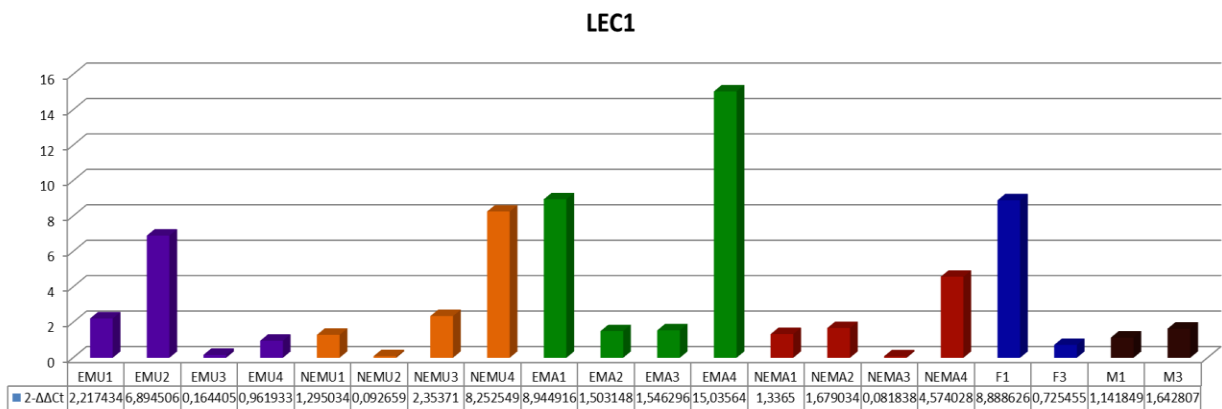


Figura 22. Resultado dos valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para o gene *LEC1* nos calos embriogênicos e não-embriogênicos durante a multiplicação e maturação, folhas e meristema. Emu (roxo): embriogênico, multiplicação; Nemu (laranja): Não-embriogênico, multiplicação; Ema (verde): Embriogênico, maturação; Nema (vermelho): Não-embriogênico, maturação; F (azul): Folha; M (preto): meristema. Quatro repetições por tratamento.

Os resultados da análise da média de transcritos mostra um perfil de aumento de transcritos de *LEC1* em amostras embriogênicas *versus* não-embriogênicas. O perfil de abundância de transcritos em amostras *in vivo* demonstra uma expressão aumentada em amostras de folhas (células diferenciadas) de 71,04% em relação ao meristema (células não-diferenciadas) (Figura 23). Apesar de um aparente perfil de expressão de *LEC1* entre amostras embriogênicas e não-embriogênicas é evidente a grande variabilidade das amostras entre os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Figura 23).

Em cenoura a expressão de *LEC1* em embriões somáticos aumentou gradualmente e atingiu o seu pico em sete dias após a indução (estágio embrionário) e, em seguida diminuiu ao longo da maturação do embrião somático (Yazawa *et al.*, 2004).

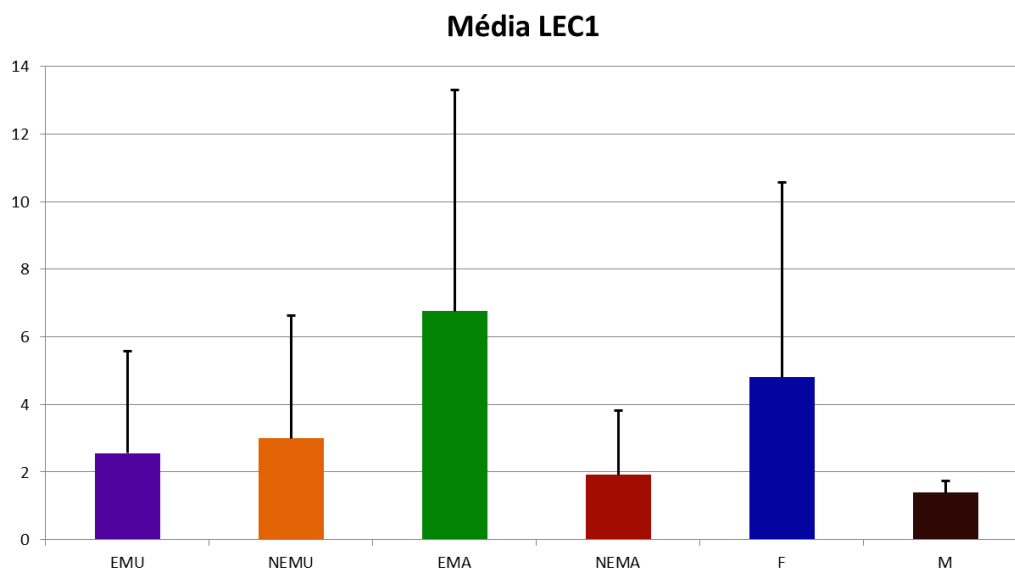


Figura 23. Resultado da média dos valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para o gene *LEC1* nos calos embriogênicos e não-embriogênicos durante a multiplicação e maturação, folhas e meristema. Emu (roxo): embriogênico, multiplicação; Nemu (laranja): Não-embriogênico, multiplicação; Ema (verde): Embriogênico, maturação; Nema (vermelho): Não-embriogênico, maturação; F (azul): Folha; M (preto): meristema. Dados representam médias de 4 repetições \pm EP.

Um dos primeiros genes descritos como envolvidos na expressão da competência celular foi o *Somatic Embryogenesis Receptor Kinase (DcSERK)* em cultura de tecidos de *Daucus carota* (Schmidt *et al.*, 1997). Estudos voltados para a demonstração da correlação entre o potencial embriogênico e o padrão de expressão de genes específicos levaram à identificação dos genes *SERK* em diversas espécies de plantas (Baudino *et al.*, 2001). A expressão do gene *SERK* tem sido utilizada como um marcador, dentro de uma população de células embriogênicas competentes e não competentes (Santa-Catarina *et al.*, 2004). Esta situação também foi identificada para outros sistemas como: *Arabidopsis (AtSERK1)* (Hecht *et al.*, 2001), *Dactylis glomerata (DgSERK)* (Somleva *et al.*, 2000), *Medicago trunculata (MtSERK1)* (Nolan *et al.*, 2003), *Ananas comosus* (Ma *et al.*, 2012). Porém em cana-de-açúcar ainda não possui nenhum relato na literatura do perfil de caracterização de expressão desses genes.

Os resultados da análise dos transcritos de *SERK1* mostra que os CE e CNE em multiplicação (EMU e NEMU) obtiveram uma maior quantidade de transcritos em relação aos CE e CNE em maturação (EMA e NEMA). Similar aos controles, que obtiveram um aumento de transcritos nas amostras do meristema (células não-

diferenciadas), que tiveram quantidade de transcritos de 1,411602 e 2,70247 nas amostras M1 e M3, respectivamente, versus amostra de folha (células diferenciadas), que foram de 0,80902 e 0,36931 quantidades de transcritos, respectivamente, F1 e F3. Porém, ocorre uma grande variabilidade da quantidade de transcritos em cada repetição de cada tratamento (Figura 24).

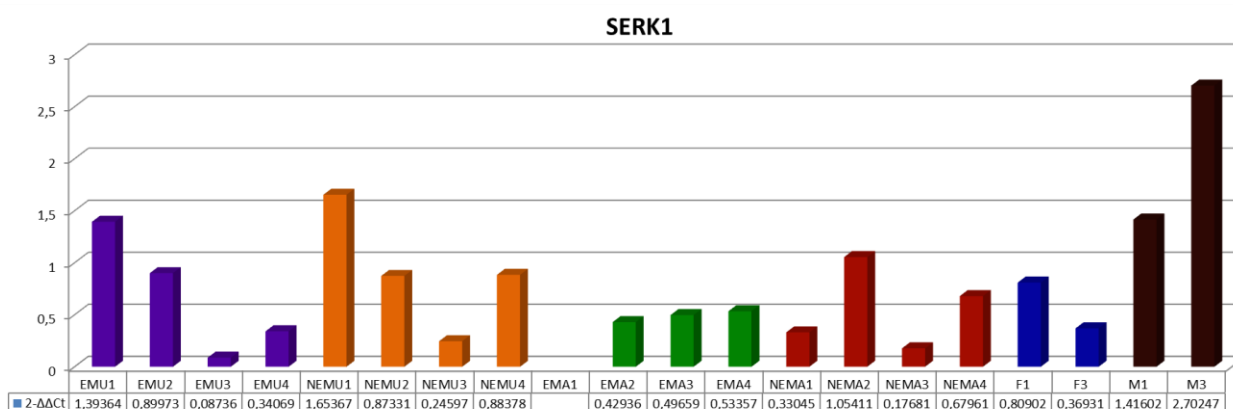


Figura 24. Resultado dos valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para o gene *SERK1* nos calos embriogênicos e não-embriogênicos durante a multiplicação e maturação, folhas e meristema. Emu (roxo): embriogênico, multiplicação; Nemu (laranja): Não-embriogênico, multiplicação; Ema (verde): Embriogênico, maturação; Nema (vermelho): Não-embriogênico, maturação; F (azul): Folha; M (preto): meristema. Quatro repetições por tratamento.

Os resultados da análise da média de transcritos mostram um perfil de aumento de transcritos de *SERK1* em amostras durante a multiplicação *versus* durante a maturação. A média das amostras embriogênicas de multiplicação tiveram uma maior quantidade de transcritos, de 28,49% em comparação a média das amostras embriogênicas de maturação. Esse perfil é visto também para as amostras não-embriogênicas, em que as amostras não-embriogênicas de multiplicação tiveram uma maior quantidade de transcritos, de 38,72% em comparação a média das amostras não-embriogênicas de maturação. O perfil de abundância de transcritos em amostras *in vivo* demonstra uma expressão aumentada no meristema (células não-diferenciadas) de 71,39% em comparação a amostras de folhas (células diferenciadas) (Figura 25).

Em muitos casos relatados na literatura, a expressão dos homólogos de *SERK* inicia-se nos estágios iniciais do embrião, como observado em *A. angustifolia* (Steiner *et al.*, 2012). Expressão do gene *SERK* em centeio está envolvido na

indução de embriogênese somática iniciada a partir de embriões imaturos e sua expressão é suprimida nas fases posteriores de cultivo *in vitro*. (Gruszczynska e Rakoczy-Trojanowska, 2011). Desta forma, o gene *SERK* pode ser considerado um confiável marcador molecular para as células com potencial embriogênico. A expressão de homólogos de *SERK* não só marca as células competentes para formar embriões, mas também está envolvida em conferir a competência embriogênica e pode ser um componente para a via de sinalização da embriogênese (Santa-Catarina *et al.*, 2004).

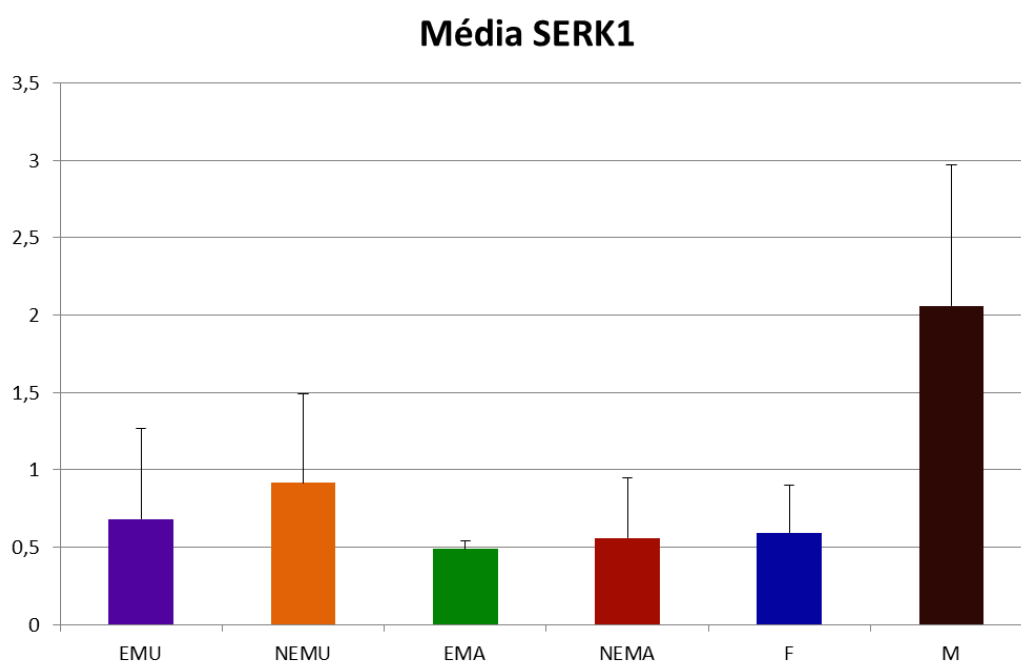


Figura 25. Resultado da média dos valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para o gene *SERK1* nos calos embriogênicos e não-embriogênicos durante a multiplicação e maturação, folhas e meristema. Emu (roxo): embriogênico, multiplicação; Nemu (laranja): Não-embriogênico, multiplicação; Ema (verde): Embriogênico, maturação; Nema (vermelho): Não-embriogênico, maturação; F (azul): Folha; M (preto): meristema.

Savona e colaboradores (2012) mostraram que os genes *CpSERK1* e *CpSERK2* (*Cyclamen persicum* Mill.) são expressos em células embriogênicas e pode ser considerada marcadores de pluripotência *in vivo* e *in vitro*. Além disso, foi encontrado uma correlação estreita entre a expressão de *CpSERK1/ CpSERK2* relacionado ao potencial embriogênico *in vitro*, sugerindo uma elevada expressão dos dois genes, e isto leva a totipotência e consequente formação de embriões somáticos.

Os resultados da análise dos transcritos de *SERK2* demonstraram um mesmo perfil que o gene *SERK1*, isto é, os CE e CNE em multiplicação (EMU e NEMU) obtiveram uma maior quantidade de transcritos em relação aos CE e CNE em maturação (EMA e NEMA), porém com uma grande variabilidade de expressão entre as amostras, como em NEMU, em que NEMU1 possui 2,28487 de quantidade de transcritos enquanto o NEMU4 possui 0,18219 de quantidade de transcritos. Os controles obtiveram um aumento de transcritos nas amostras do meristema (células não-diferenciadas), com quantidade de transcritos de 1,94841 e 0,91799 no M1 e M3, respectivamente, versus amostra de folha (células diferenciadas), que teve uma quantidade de transcritos de 0,99345 e 0,49189 nas F1 e F3, respectivamente. Ocorre também uma grande variabilidade da quantidade de transcritos em cada repetição de cada tratamento (Figura 26).

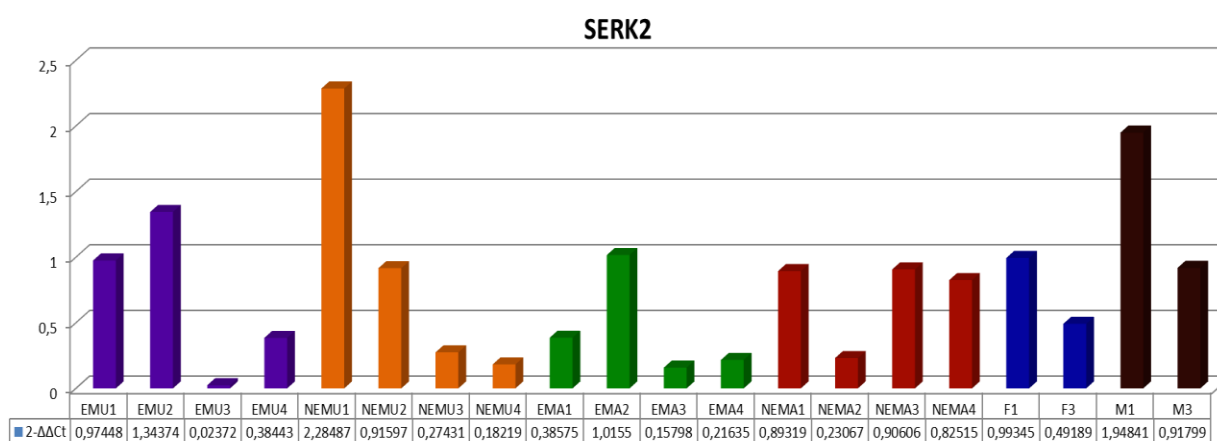


Figura 26. Resultado dos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para o gene *SERK2* nos calos embriogênicos e não-embriogênicos durante a multiplicação e maturação, folhas e meristema. Emu (roxo): embriogênico, multiplicação; Nemu (laranja): Não-embriogênico, multiplicação; Ema (verde): Embriogênico, maturação; Nema (vermelho): Não-embriogênico, maturação; F (azul): Folha; M (preto): meristema. Quatro repetições por tratamento.

Para o gene *SERK2*, os resultados da análise da média de transcritos mostra um perfil similar à análise de transcritos do gene *SERK1*. Ocorreu um alto número de transcritos em amostras durante a multiplicação *versus* as amostras durante a maturação. A média das amostras embriogênicas de multiplicação tiveram uma maior quantidade de transcritos, de 34,87% em comparação a média das amostras embriogênicas de maturação. Esse perfil é visto também para as amostras não-

embriogênicas, as amostras não-embriogênicas de multiplicação tiveram uma maior quantidade de transcritos, de 21,94% em comparação a média das amostras não-embriogênicas de maturação. O perfil de abundância de transcritos em amostras *in vivo* demonstra uma expressão aumentada no meristema (células não-diferenciadas) de 48,18% em relação a amostras de folhas (células diferenciadas), assim como no gene *SERK1*, porém em menores proporções de quantidade de transcritos (Figura 27).

Os genes *CpSERK1* e *CpSERK2* são expressos principalmente no início da fase da embriogênese somática. Foi encontrado uma forte correlação entre a expressão de *CpSERK1* e *CpSERK2* e o potencial embriogênico dos tecidos (Savona *et al.*, 2012). A expressão embriogênica foi elevada e a expressão organogênica foi moderada. No entanto, a observação de que *CpSERK1* e *CpSERK2* também são expressos durante as fases iniciais da organogênese, a um nível menor do que a embriogênese, sugere que ambos os genes são necessário para o envolvimento do controle precoce do desenvolvimento *in vitro* (Savona *et al.*, 2012).

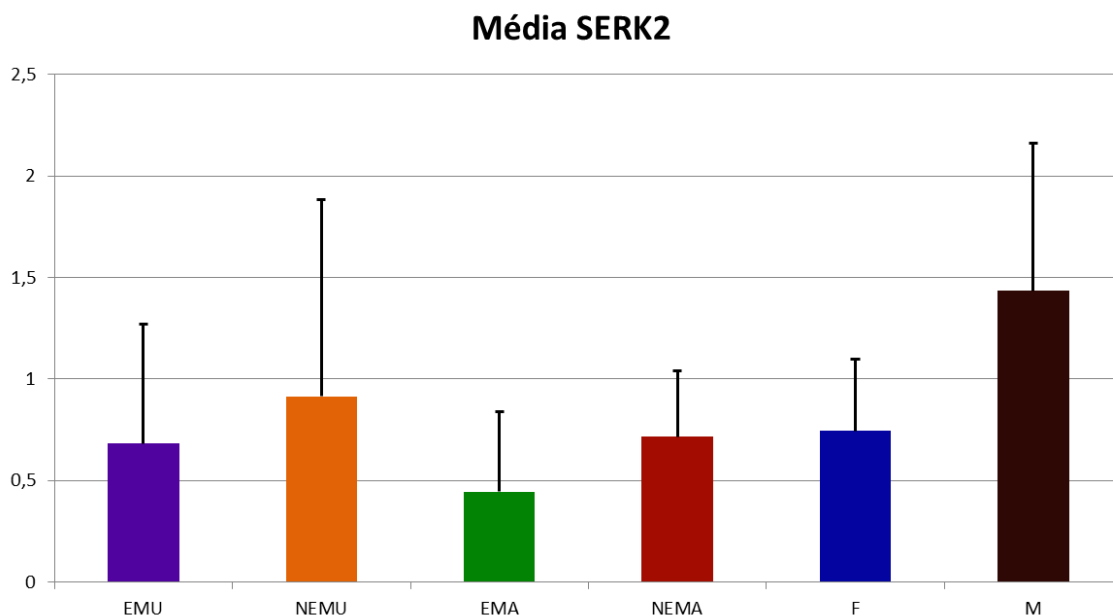


Figura 27. Resultado da média dos valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para o gene *SERK2* nos calos embriogênicos e não-embriogênicos durante a multiplicação e maturação, folhas e meristema. Emu (roxo): Embriogênico, multiplicação; Nemu (laranja): Não-embriogênico, multiplicação; Ema (verde): Embriogênico, maturação; Nema (vermelho): Não-embriogênico, maturação; F (azul): Folha; M (preto): Meristema.

Para *Cyclamen persicum*, a similaridade de aminoácidos elevada entre as duas proteínas *CpSERK1* e *CpSERK2*, suas relações filogenéticas, o perfil de expressão semelhante e o padrão de expressão de sobreposição, pode sugerir que eles atuam juntos (Savona *et al.*, 2012).

A expressão do gene *CLF* não foi amplificada no Real Time PCR. Não ocorreu expressão dos transcritos nas amostras.

5. CONCLUSÃO

As análises *in silico* mostraram que a cana-de-açúcar possui alta homologia com as espécies alinhadas, tais como, sorgo, milho e arabidopsis.

Foi encontrado perfil de expressão na análise de abundância dos transcritos entre os calos embriogênicos e calos não-embriogênicos durante a multiplicação e maturação e também em folhas e meristema. A análise dos resultados demonstra que os perfis de expressão são diferentes e em alguns casos antagônicos entre amostras de culturas embriogênicas e não-embriogênicas.

Estudos visando a caracterização da expressão destes genes podem auxiliar na elucidação de mecanismos básicos relacionados à fisiologia, bioquímica e biologia molecular da embriogênese somática, além de auxiliar na compreensão da regulação deste processo morfogênético em cana-de-açúcar. E possibilitarão a identificação de culturas com competência para embriogênese e o monitoramento do desenvolvimento adequado dos embriões somáticos nestas espécies de interesse científico e tecnológico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aichinger, E.; Villar, C.B.R.; Farrona, S.; Reyes, J.C.; Hennig, L.; Kohler, C. (2009) CHD3 proteins and polycomb group proteins antagonistically determine cell identity in *Arabidopsis*. *Plos Genetics*. 5: 1-12.
- Albrecht, C.; Russinova, E.; Hecht, V.; Baaijens, E.; Vries S.C. (2005) The *Arabidopsis thaliana* Somatic embryogenesis receptor-like kinases 1 e 2 control male sporogenesis. *Plant Cell*. 17: 3337–3349.
- Arencibia, A.D.; Carmona, E.R.; Téllez, P.; Chan, M.T.; Yu, S.M.; Trujillo, L.E.; Oramas, P. (1998) An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Transgenic Research*. 7: 213-222.
- Asad, S.; Arshad, M.; Mansoor, S.; Zafar, Y. (2009) Effect of various amino acids on shoot regeneration of sugarcane (*Sacchrum officinarum* L.). *African Journal of Biotechnology*. 8: 1214-1218.
- Asnaghi C.; Paulet F.; Kaye C.; Grivet L.; Deu M.; Glaszmann J.C.; D'Hont A. (2000). Application of synteny across Poaceae to determine the map location of a sugarcane rust resistance gene. *Theoretical and Applied Genetics*. 101: 962-969.
- Baudino, S.; Hansen, S.; Brettschneider, R.; Hecht, V.F.G.; Dresselhaus, T.; Lorz, H.; Dumas, C.; Rogowsky, P.M. (2001) Molecular characterization of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the *SERK* gene family. *Planta*. 213: 1-10.
- Beauclair, E.G.F. (2009) Desenvolvimento da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) sob diferentes formas de colheita e de manejo do palhiço. Doutorado em Fitotecnia, USP. Piracicaba. 111p.
- Becraft, P.W. (1998) Receptor kinase in plant development. *Trends in Plant Science*. 3: 384-388.
- Becraft, P.W. (2002) Receptor kinase signaling in plant development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 18: 163-192.
- Belintani, N.G.; Guerzoni, J.T.S.; Moreira, R.M.P.; Vieira, L.G.E. (2012) Improving low-temperature tolerance in sugarcane by expressing the *ipt* gene under a cold inducible promoter. *Biologia Plantarum*. 56: 71-77.

- Briggs, R.; King, T.J. (1952) Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 38: 455-463.
- Casson, S.A.; Lindsey, K. (2006) The turnip Mutant of Arabidopsis Reveals That Leafy Cotyledon1 Expression Mediates the Effects of Auxin and Sugars to Promote Embryonic Cell Identity. *Plant Physiology*. 142: 526–541.
- Chengalrayan, K.; Abouzid, A.; Gallo-Meagher, M. (2005) *In vitro* regeneration of plants from sugarcane seed-derived callus. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*. 41: 477-482.
- Chinnusamy, V.; Zhu, J.K. (2009) Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Plant Biology*. 12: 1-7.
- Cidade, D.A.P.; Garcia, R.O.; Duarte, A.C.; Sachetto-Martins, G.; Mansur, E. (2006) Morfogênese *in vitro* de variedades brasileiras de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 41: 385-391.
- Conab. Companhia Nacional de Abastecimento (2013) Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, segundo levantamento, agosto/2013. *Companhia Nacional de Abastecimento*. Brasília.
- Corpet, F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*. 16: 10881-10890.
- D'Hont, A.; Ison, D.; Alix, K.; Roux, C.; Glaszmann, J.C. (1998) Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. *Genome*. 41: 221–225.
- Dong, J.Z.; Dunstain, D.I. (2000) Molecular biology of somatic embryogenesis in conifers. *Molecular biology of woody plants. Forestry Sciences*. 1: 51-87.
- Duranthon, V.; Watson, A.J; Lonergan, P. (2008) Preimplantation embryo programming: transcription, epigenetics, and culture environment. *Reproduction*. 135: 141–150.
- Fehér, A.; Pasternak, T.P.; Dudits, D. (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 74: 201-208.
- Fehér, A. (2006) Why Somatic Plant Cells Start to form Embryos? *Plant Cell Monographs*. 2: 85-101.

- Floh, E.I.S.; Santa-Catarina, C.; Silveira, V. (2007) Marcadores bioquímicos e moleculares para estudos da morfogênese *in vitro*. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*. 13: 1992-2001.
- Gale, M. D.; Devos, K.M. (1998) Comparative genetics in the grasses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95: 1971–1974.
- Garcês, S.P.S.; Lima, A.O.S. (2004) Desenho e Validação *in silico* de *Primers* Intragenéricos. In: II Workshop de Tecn. da Inf. aplicada ao Meio Ambiente – CBComp.
- George, E.F.; Hall, M.A.; De Klerk, G.J. (2008) Plant propagation by tissue culture. 3^o ed. *Springer*. 501p.
- Glaszmann J.C.; Dufour P.; Grivet L.; D'Hont A.; Deu M.; Paulet F.; Hamon P. (1997). Comparative genome analysis between several tropical grasses. *Euphytica* 96: 13-21.
- Grivet, L. Arruda, P. (2002) Sugarcane genomics: depicting the complex genome of a important tropical crop. *Plant Biology*. 5: 122-127.
- Gruszczynska, A.; Rakoczy-Trojanowska, M. (2011) Expression analysis of somatic embryogenesis-related SERK, LEC1, VP1 and NiR ortologues in rye (*Secale cereale* L.). *Journal Applied Genetics*. 52:1-8.
- Guerra, M.P.; Torres, A.C.; Teixeira, J.B. (1999) Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: Torres AC, Caldas LS, Buso JA. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. *Brasília: Embrapa*. 2: 533-568.
- Guiderdoni, E.; Demarly Y. (1988) Histology of somatic embryogenesis in cultured leaf segments of sugarcane plantlets. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 14: 71-88.
- Handro, W. & Floh, E. I. S. (1990) Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In: Técnicas e aplicações da cultura de tecido de plantas. *Brasília: Embrapa*. 203-212.
- Hanks, S.K. (2003). Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. *Genome Biology*. 4: 111.
- Hanna, J.H.; Krishanu Saha, K.; Jaenisch, R. (2010) Pluripotency and Cellular Reprogramming: Facts, Hypotheses, Unresolved Issues. *Cell*. 143: 508-525.
- Hashimoto, K.; Kokubun, S.; Itoi, E.; Roach, H.I. (2007) Improved quantification of DNA methylation using methylation-sensitive restriction enzymes and real-time PCR. *Epigenetics*. 2: 86-91.

- Hecht, V.; Vielle-Calzada, J.P.; Hartog, M.V.; Schmidt, E.D.L.; Boutilier, K.; Grossniklaus, U.; De Vries, S.C. (2001) The *Arabidopsis Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 1* gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiology*. 127: 803–816.
- Henderson, J.T.; Li, H.C.; Rider, S.D.; Mordhorst, A.P.; Romero-Severson, J.; Cheng, J.C.; Robey, J.; Sung, Z.R.; Vries, S.C.; Ogas, J. (2004) Pickle acts throughout the Plant to Repress Expression of Embryonic Traits and May Play a Role in Gibberellin-Dependent Responses. *Plant Physiology*. 134: 995-1005.
- Hochedlinger, K.; Plath, K. (2009) Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development*. 136: 509-523.
- Iskandar, H. M.; Simpson, R.S.; Casu, R.E.; Bonnett, G.D.; Maclean, D.J.; Manners, J.M. (2004) Comparison of Reference Genes for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Analysis of Gene Expression in Sugarcane. *Plant Molecular Biology Reporter* 22: 325-337.
- Ito, Y.; Takaya, K.; Kurat, N. (2005) Expression of SERK family receptor-like protein kinase genes in rice. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1730: 253 – 258.
- Jain, S.M.; Brar, D.S.; Ahloowalia, B.S. (1998) Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. *Kluwer Academic Publishers*, UK.
- Jain, S.M. (2000) Mechanisms of spontaneous and induced mutations in plants. *Radiation Res.* 2: 255–258.
- Jain, S.M. (2001) Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica*. 118: 153–166.
- Jannoo, N.; Grivet, L.; Chantret, N.; Garsmeur, O.; Glaszmann, J.C.; Arruda, P.; D'Hont, A. (2007). Orthologous comparison in a gene-rich region among grasses reveals stability in the sugarcane polyploid genome. *The Plant Journal*. 50: 574-585.
- Jimenez, V.M. (2005) Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation*. 47: 91–110.
- Junker, A.; Baumlein, H. (2012) Multifunctionality of the LEC1 transcription factor during plant development. *Plant Signaling and Behavior*. 7: 1718-1720.
- Klimaszewska, K.; Morency, F.; Jones-Overton, C.; Cooke, J. (2004) Accumulation pattern and identification of seed storage proteins in zygotic embryos of *Pinus*

- strobilus and in somatic embryos from different maturation treatments. *Physiologia Plantarum*. 121: 682-690.
- Kobe, B.; Kajava, A.V. (2001) The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Current opinion in structural biology*. 11: 725-732.
- Koehler, A.D. (2010) Reprodução em *Brachiaria* spp.: *SERK* (Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase) no desenvolvimento da antera, do ovário e na embriogênese. Tese de Doutorado em Ciências. USP. 108p.
- Kwong, R.W.; Bui, A.Q.; Lee, H.; Kwong, L.W.; Fischer, R.L.; Goldberg, R.B.; Harada, J. (2003) Leafy cotyledon1-Like defines a class of regulators essential for embryo development. *Plant Cell*. 15: 5-18.
- Lakshmanan, P.; Geijskes, R.J.; Aitken, K.S.; Grof, C.L.P.; Bonnett, G.D.; Smith, G.R. (2005) Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. 41: 345-363.
- Lakshmanan P. (2006a) Somatic embryogenesis in sugarcane. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. 42: 201-205.
- Lakshmanan, P.; Geijskes, R.J.; Wang, L.; Elliott, A.; Grof, C.P.; Berding, N.; Smith, G.R. (2006b) Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids) leaf cultures. *Plant Cell Reports*. 25:1007-1015.
- Lameira A.O., Pinto J.E.B.P., Arrigoni-Blank M.F., Cardoso M.G. (1997) Efeito de compostos fenólicos, carvão ativado e do meio físico no desenvolvimento de segmento nodal de *Cordia verbenácea* L. *Ciência Rural*. 27: 189-192.
- Larkin, P.J.; Scowcroft, S.C. (1981) Somaclonal variation – a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*. 60: 197–214.
- Lee, T.S.G.; Bressan, E.A.; Corrêa-da-Silva, A.D.; Lee, L.L. (2007) Implantação de biofábrica de cana-de-açúcar: riscos e sucessos. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*. 13: 2032-2040.
- Leon, P.M.M.; Campos, V.F.; Kaefer, C.; Begnini, K.R.; Collares, T.F.; Amaral, M.G.; Descahmps, J.C.; Collares, T. (2009) Delineamento *in silico* e avaliação *in vitro* de genes apoptóticos em oócitos equinos. Resumo da XI ENPOS e I Mostra Científica.
- Lisby, G. (1999) Application of nucleic acid amplification in clinical microbiology. *Molecular Biotechnology*. 12: 75-99.

- Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods*. 25: 402–408.
- Ma, J.; SanMiguel, P.; Lai, J.; Messing, J.; Bennetzen, J.L. (2005) DNA rearrangement in orthologous orp regions of the maize, rice and sorghum genomes. *Genetics*. 170, 1209–1220.
- Ma, J.; He, Y.; Wu, C.; Liu, H.; Hu, Z.; Sun, G. (2012) Cloning and Molecular Characterization of a SERK Gene Transcriptionally Induced During Somatic Embryogenesis in *Ananas comosus* cv. Shenwan. *Plant Molecular Biology Reporter*. 30:195–203.
- Malone, G.; Zimmer, P.D.; Meneghello, G.E.; Binneck, E.; Peske, S.T. (2006) Prospecção de genes em bibliotecas de cDNA. *Revista Brasileira de Agrociência*. 12: 07-13.
- Manickavasagam, M.; Ganapathi, A. (1998) Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of sugarcane. *Indian Journal of Experimental Biology*. 36: 832–835.
- Marques, D.; Villari, A.C.; Lerayer, A.. (2009) Guia da Cana-de-açúcar : Avanço científico beneficia o país. Conselho de informações sobre biotecnologia. Setembro/2009; Embrapa; ESALQ; Unicamp.
- Marsoni, M.; Bracale, M.; Espen, L.; Prinsi, B.; Negri, A.S.; Vannini, C. (2008) Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Vitis vinifera*. *Plant Cell Reports*. 27: 347-356.
- Mayama, T.; Ohtsubo, E.; Tsuchimoto, S. (2003) Isolation and Expression Analysis of Petunia CURLY LEAF-Like Genes. *Plant and Cell Physiology*. v.44, p.811–819.
- Meinke, D. W. (1995) Molecular Genetics of Plant Embryogenesis. *Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 46: 369-394.
- Menossi, M.; Silva-Filho, M.C.; Vincentz, M.; Van Sluys, M.A.; Souza, G.M. (2008) Sugarcane functional genomics: gene Discovery for agronomic trait development. *International Journal Plant Genomics*. 2008: 1-11.
- Ming, R.; Liu, S.C.; Moore, P.H.; Irvine, J.E.; Paterson, A.H. (1998) QTL analysis in a complex autopolyploid: Genetic control of sugar content in sugarcane. *Genome Research*. 11: 2075-2084.

- Murashige, T.; Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*. 15: 473-497.
- Nieves, N.; Segura-Nieto, M.; Blanco, M.A.; Sanchez, M.; González, A.; González, J.L.; Castillo, R. (2003) Biochemical characterization of embryogenic and non-embryogenic calluses of sugarcane. *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant*. 39: 343-345.
- Nieves, N.; Sagarra, F.; González, R.; Lezcano, Y.; Cid, M.; Blanco, M.A.; Castillo, R. (2008) Effect of exogenous arginine on sugarcane (*Saccharum sp.*) somatic embryogenesis, free polyamines and the contents of the soluble proteins and proline. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 95: 313-320.
- Nolan, K.E.; Irwanto, R.R.; Rose, R.J. (2003) Auxin up-regulates *MtSERK1* expression in both *Medicago trunculata* root-forming and embryogenic cultures. *Plant Physiology*. 133: 218-230.
- Nolan, K.E.; Kurdyukov, S.; Rose, R.J. (2009) Expression of the Somatic Embryogenesis Receptor Like Kinase1 (*SERK1*) gene is associated with developmental change in the life cycle of the model legume *Medicago truncatula*. *Journal of Experimental Botany*. 60: 1759-1771.
- Nhut, D.T.; Le, B.V.; Fukai, S.; Tanaka, M.; Van, K.T.T. (2001) Effects of activated charcoal, explant size, explants position and sucrose concentration on plant and shoot regeneration of *Lilium longiflorum* via young stem culture. *Plant Growth Regulation*. 33: 59-65.
- Ogas, J.; Cheng, J.C.; Sung, Z.R.; Somerville, C. (1997) Cellular differentiation regulated by gibberellin in the *Arabidopsis thaliana* pickle mutant. *Science*. 277: 91-94.
- Ogas, J.; Kaufmann, S.; Henderson, J.; Somerville, C. (1999) PICKLE is a CHD3 chromatin-remodeling factor that regulates the transition from embryonic to vegetative development in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Science*. 96: 13839–13844.
- Oropeza, M.; Marcano, A.K.; De García, E. (2001) Proteins related with embryogenic potential in callus and cell suspensions of sugarcane (*Saccharum sp.*). *In Vitro Cell. Developmental Biology - Plant*. 37: 211-216.
- Pan, M.J.; Staden, J.V. (1999) Effect of charcoal, autoclaving and culture media on sucrose hydrolysis. *Plant Growth Regulation*. 29: 135-141.

- Peredo, E.L.; Arroyo-García, R.; Reed, B.M.; Revilla, M.A. (2008) Genetic and epigenetic stability of cryopreserved and cold-stored hops (*Humulus lupulus* L.) *Cryobiology*. 57: 234–241.
- Piperidis, G; Piperidis, N; D'Hont, A. (2010) Molecular cytogenetic investigation of chromosome composition and transmission in sugarcane. *Molecular Genetics and Genomics*. 284:65-73.
- Prabu, G.; Prasad, D.T. (2012) Functional characterization of sugarcane MYB transcription factor gene promoter (PScMYBAS1) in response to abiotic stresses and hormones. *Plant Cell Reports*. 31: 661–669.
- Quiroz-Figueroa, F.R.; Rojas-Herrera, R.; Galaz-Avalos, R.M.; Loyola-Vargas, V.M. (2006) Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 86: 285-301.
- Rhee, Y.; Sekhon, R.S.; Chopra, S.; Kaeppler, S. (2010) Tissue culture-induced novel epialleles of a Myb transcription factor encoded by pericarp color1 in maize. *Genetics*. 186: 843–855.
- Rider, S.D.; Henderson, J.T.; Jerome, R.E.; Edenberg, H.J.; Romero-Severson, J.; Ogas, J. (2003) Coordinate repression of regulators of embryonic identity by PICKLE during germination in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 35:33-43.
- Rout, G.R.; Mohapatra, A.; Mohan, J.S. (2006) Tissue culture of ornamental pot plant: a critical review on present scenario and future prospects. *Biotechnology Advances*. 24: 531-560.
- Salaj, J.; Recklinghausen, I.R.; Hecht, V.; Vries, S.C.; Schel, J.H.N.; Lammeren, A.M.A. (2008) AtSERK expression precedes and coincides with early somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 46: 709-714
- Santa-Catarina, C.; Hanai, L.R.; Dornelas, M.C.; Viana, A.M.; Floh, E.I.S. (2004) SERK gene homolog expression, polyamines and amino acids associated with somatic embryogenic competence of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 79: 53-61.
- Santiago, A.D.; Ivo, W.M.P.M.; Barbosa, G.V.S.; Rosseto, R. (2006) Impulsionando a Produtividade e a Produção Agrícola da Cana-de-Açúcar no Brasil. Workshop Internacional sobre Desenvolvimento da Agricultura Tropical. Transformando

a Agricultura Tropical: Uma avaliação das Principais Inovações Tecnológicas, Institucionais e Políticas; Brasília.

- Savona, M.; Mattioli, R.; Nigro, S.; Falasca, G.; Della Rovere, F.; Costantino, P.; Vries, S.; Ruffoni, B.; Trovato, M.; Altamura, M.M. (2012) Two *SERK* genes are markers of pluripotency in *Cyclamen persicum Mill.* *Journal of Experimental Botany*. 63: 471–488.
- Schmidt, E.D.L.; Guzzo, F.; Toonen, M.A.J.; De Vries, S.C. (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development*. 124: 2049–2062.
- Shibukawa, T.; Yazawa, K.; Kikuchi, A.; Kamada, H. (2009) Possible involvement of DNA methylation on expression regulation of carrot *LEC1* gene in its 5'-upstream region. *Gene*. 437: 22–31.
- Shiu, S.H.; Bleecker, A.B. (2001) Plant Receptor-Like Kinase Gene Family: Diversity, Function and Signaling. *Science*. 113: 1-13.
- Silvarolla, M.B. (1992) Plant genomic alterations due to tissue culture. *Journal of Brazilian Association of Advanced Science*. 44: 329-335.
- Silveira, V.; Floh, E.I.S.; Handro, W.; Guerra, M.P. (2004) Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 76: 53-60.
- Silveira, V.; Santa-Catarina, C.; Tun, N.N.; Scherer, G.F.E.; Handro, W.; Floh, E.I.S. (2006) Polyamines effects on the endogenous polyamines contents, nitric oxide release growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. *Plant Science*. 171: 91-98.
- Silveira, V.; de Vita, A.M.; Macedo, A.F.; Dias, M.F.R.; Floh, E.I.S.; Santa-Catarina, C. (2013) Morphological and polyamine content changes in embryogenic and non-embryogenic callus of sugarcane. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*.
- Singh, M.B.; Bhalla, P.L.; Russell, S.D. (2008) Molecular repertoire of flowering plant male germ cells. *Sexual Plant Reproduction*. 21: 27-36.
- Skirvin, R.M.; Norton, M.; McPheeters, K.D. (1993) Somaclonal variation: has it proved useful for plant improvement. *Acta Horticulturae*. 336: 333–340.
- Smulders, M.J.M.; Klerk, G.J. (2011) Epigenetics in plant tissue culture. *Plant Growth Regulation*. 63: 137-146.

- Somleva, M.N.; Schmidt, E.D.L.; De Vries, S.C. (2000) Embryogenic cells in *Dactylis glomeranta* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by *SERK* expression. *Plant Cell Report*. 19: 718-726.
- Steiner, N.; Santa-Catarina, C.; Andrade, J.B.R.; Balbuena, T.S.; Guerra, M.P.; Handro, W.; Floh, E.I.S.; Silveira, V. (2008) *Araucaria angustifolia* Biotechnology - Review. *Functional Plant Science and Biotechnology*. 2: 20-28.
- Steiner, N.; Santa-Catarina, C.; Guerra, M.P.; Cutri, L.; Dornellas, M.C.; Floh, E.I.S. (2012) A gymnosperm homolog of somatic embryogenesis receptor-like kinase 1 (*SERK1*) is expressed during somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 109:41-50.
- Stevenson, G.C. (1965) Genetics and breeding of sugarcane. London, Longmans. 284p.
- Sun, L.; Wu, Y.; Su, S.; Liu, H.; Yang, G.; Li, S.; Shan, X.; Yuan, Y. (2011) Differential gene expression during somatic embryogenesis in the maize (*Zea mays* L.) inbred line H99. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 109: 271-286.
- Tanurdzic, M.; Vaughn, M.W.; Jiang, H.; Lee, T.J.; Slotkin, R.K.; Sosinski, B. (2008) Epigenomic consequences of immortalized plant cell suspension culture. *PLoS Biology*. 6: 2880–2895.
- Taparia, Y.; Fouad, W.M.; Gallo, M.; Altpeter F. (2012) Rapid production of transgenic sugarcane with the introduction of simple loci following biolistic transfer of a minimal expression cassette and direct embryogenesis. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. 48: 1-15.
- Thiebaut, F.; Graviton, C.; Carnavale-Bottino, M.; Rojas, C.A.; Tanurdzic, M.; Farinelli, L.; Martienssen, R.A.; Hemerly, A.S.; Ferreira, P.C.G. (2012) Computational identification and analysis of novel sugarcane microRNAs. *BMC Genomics*. 13:1-14.
- Taurus, T.E.; Fowke, L.C.; Dunstan, D.I. (1991) Somatic embryogenesis in conifers. *Canadian Journal of Botany*. 69: 1873-1899.
- Thomas, T.D. (2008) The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances*. 26: 618-631.
- Thorpe, T.A. (1995) *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 557p.

- Vettore, A.L., da Silva F.R., Kemper, E.L., Arruda, P. (2001) The libraries that made SUCEST. *Genetics Molecular Biology* 24: 1- 7.
- Vettore, A.L.; Silva, F.R.; Kemper, E.L.; Souza, G.M.; Silva, A.M.; Ferro, M.I., Henrique-Silva, F., Giglioti, E.A., Lemos, M.V., Coutinho, L.L., Nobrega, M.P., Carrer, H., França, S.C., Bacci Júnior, M., Goldman, M.H., Gomes, S.L., Nunes, L.R., Camargo, L.E., Siqueira, W.J., Van Sluys, M.A., Thiemann, O.H., Kuramae, E.E., Santelli, R.V., Marino, C.L., Targon, M.L., Ferro, J.A., Silveira, H.C., Marini, D.C., Lemos, E.G., Monteiro-Vitorello, C.B., Tambor, J.H., Carraro, D.M., Roberto, P.G., Martins, V.G., Goldman, G.H., de Oliveira, R.C., Truffi, D., Colombo, C.A., Rossi M, de Araujo PG, Sculaccio SA, Angella A, Lima MM, de Rosa Júnior VE, Siviero F, Coscrato, V.E., Machado, M.A., Grivet, L., Di Mauro, S.M., Nobrega, F.G., Menck, C.F., Braga, M.D., Telles, G.P., Cara, F.A., Pedrosa, G., Meidanis, J., Arruda, P. (2003) Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. *Genome Research*. 13: 2725-2735.
- Veiga, C.F.M.; Vieira, J.R.; Morgado, I.F. (2006) Diagnóstico da cadeia produtiva de cana-de-açúcar do Estado do Rio de Janeiro: relatórios de pesquisa. Rio de Janeiro: FAPERJ, SEBRAE-RJ.
- Verdeil JL, Alemanno L, Niemenak N, Trangarder TJ (2007) Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy. *Trends in Plant Science*. 12:245–252.
- Yazawa, K., Takahata, K., Kamada, H., (2004) Isolation of the gene encoding Carrot leafy cotyledon1 and expression analysis during somatic and zygotic embryogenesis. *Plant Physiology*. 42, 215–223.
- Waclawovsky, A.J.; Sato, P.M.; Lembke, C.G.; Moore, P.H.; Souza, G.M. (2010) Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. *Plant Biotechnology Journal*. 8: 263–276.
- Werner, E.T.; Lima, A.B.P.; Amaral, J.A.T. (2012) Expressão gênica na embriogênese somática vegetal. *Enciclopédia Biosfera*, Centro científico conhecer. 8: 552p.
- Willemsen, V.; Scheres, B. (2004) Mechanisms of pattern formation in plant embryogenesis. *Annals Review Genetics*. 38: 587-614.

- Zhang, H.; Bishop, B.; Ringenberg, W.; Muir, W.M.; Ogas, J. (2012) The CHD3 Remodeler PICKLE Associates with Genes Enriched for Trimethylation of Histone H3 Lysine 27. *Plant Physiology*. 159: 418–432.
- Zimmerman, J.L. (1993) Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *The Plant Cell*. 5: 1411-1423.