



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS**

**ANÁLISES *IN SILICO* DE GENES ASSOCIADOS À EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA
EM CANA-DE-AÇÚCAR**

VICTOR RAMOS CAVALCANTE

**Araras
2020**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

**ANÁLISES *IN SILICO* DE GENES ASSOCIADOS À EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA
EM CANA-DE-AÇÚCAR**

VICTOR RAMOS CAVALCANTE

ORIENTADOR: PROF^a. DR^a. MONALISA SAMPAIO CARNEIRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados como requisito parcial à obtenção do título de MESTRE EM PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

Araras

2020

Cavalcante, Victor Ramos

Análises *in silico* de genes associados à embriogênese somática em cana-de-açúcar / Victor Ramos Cavalcante -- 2020.

64f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras

Orientador (a): Monalisa Sampaio Carneiro

Banca Examinadora: Marcia Maria Rosa Magri, Helaine Carrer

Bibliografia

1. Embriogênese somática indireta. 2. Cultura de tecidos.
3. Análises *in silico*. I. Cavalcante, Victor Ramos.
- II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Helena Sachi do Amaral - CRB/8 7083



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias

Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Victor Ramos Cavalcante, realizada em 18/12/2020.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Monalisa Sampaio Carneiro (UFSCar)

Profa. Dra. Marcia Maria Rosa Magri (UFSCar)

Profa. Dra. Helaine Carrer (USP)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados.

"Quanto mais te convences de que podes ser feliz, de que tens em ti os atributos da paz, ação, resistência e amor, mais as facilidades chegam a ti. No entanto, se preferes viver em lamentações, na recusa à prática do bem ou no cultivo de vícios, ergues, desnecessariamente, barreiras a ti mesmo. Crê em ti mesmo, age e verá os resultados. Quando te esforças, a vida também se esforça para te ajudar."

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

À Emile Manoela Armange, minha parceira de vida, pelo apoio incondicional, conselhos, incentivo e companheirismo durante todo o tempo que estamos juntos. Tenho consciência de que o apoio e amor que me forneceu foram essenciais para eu concluir essa etapa da minha vida.

Aos meus pais, Almir (*in memoriam*) e Lourdes, e minha irmã Natália, por toda a paciência e por apoiarem a minha decisão de cursar uma pós-graduação e ajudarem para que eu conseguisse cumprir meus compromissos, mesmo em tempos difíceis.

À minha orientadora Prof^a Monalisa Sampaio Carneiro, por toda a compreensão e empatia sempre que precisei. Por todo o conhecimento científico e de vida que me forneceu em nossas longas reuniões e conversas casuais. Pela oportunidade de fazermos ciência juntos e amizade criada.

Ao Thiago Balsalobre, pela amizade, parceria e ensinamentos durante todo meu tempo no laboratório. Sou muito grato pelas centenas de dúvidas que me esclareceu sempre com muita paciência e cuidado.

À Isabella Valadão, técnica do laboratório de Biotecnologia de Plantas, por todo o suporte técnico e científico em meus experimentos e pela amizade que cultivamos.

À Prof^a Glaucia Mendes Souza e ao Augusto Lima Diniz da Universidade de São Paulo (USP), que viabilizaram as análises *in silico* dos experimentos, ao permitirem meu acesso ao SUCEST-FUN.

À Prof^a Maria Carolina Quecine Verdi e ao Thiago Angelo da Cruz da ESALQ/USP, pela disposição e gentileza no suporte científico e técnico de meus experimentos.

Aos meus colegas de laboratório, Carol, Iago, Guilherme e Bruna, pela amizade e parceria, pela ajuda nos experimentos, pelas risadas e ótimas conversas. Com vocês minha rotina de laboratório ficava mais colorida.

Ao pessoal do Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar (PMGCA/UFSCar), em especial ao Sandro Ferrarez, por toda a ajuda na coleta de campo do meu material de estudo.

À toda a equipe do PPGPVBA, em especial Sirlene, Mônica e Prof^a Sandra, por todas as dúvidas esclarecidas, solicitações atendidas, pela paciência e compreensão.

SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVOS	04
2.1 Geral.....	04
2.2 Específicos.....	04
3 REVISÃO DA LITERATURA	05
3.1 Cultura de tecidos.....	05
3.2 Vias de regeneração.....	07
3.3 Genes associados à embriogênese somática.....	09
4 MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1 Material vegetal.....	12
4.2 Cultivo <i>in vitro</i>	13
4.2.1 Meio de cultura.....	13
4.2.2 Inoculação dos explantes.....	14
4.2.3 Classificação de calos.....	14
4.2.4 Painel de imagens de SP80-3280.....	15
4.3 Análise <i>in silico</i>	15
4.4 Desenho de <i>primers</i> , extração de DNA e amplificação por PCR.....	16
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5.1 Introdução <i>in vitro</i>	18
5.2 Análise <i>in silico</i>	21
5.3 Filogenia.....	22
5.4 Desenho de <i>primers</i> e amplificação por PCR.....	30
6 CONCLUSÕES	33
7 LITERATURA CITADA	34
APÊNDICE	42

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Lista de acessos nos bancos de dados (NCBI e UniProt) utilizados como consulta para encontrar proteínas homólogas em <i>Sorghum bicolor</i> e outras espécies de gramíneas.....	21
Tabela 2. Pares de primers desenvolvidos para regiões exônicas presentes em genes das famílias AGL, LEC, WUS, VP1 e BBM, usando o software PRIMER3.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<p>Figura 1. Inoculação de explantes da variedade comercial SP80-3280: a) palmitos de cana; b) assepsia dos palmitos em frascos com álcool 70%; c) inoculação e secção dos discos foliares em fluxo laminar e d) placa de Petri com discos foliares em meio MS3k sólido.....</p>	13
<p>Figura 2. Etapas e metodologias empregadas na análise <i>in silico</i>, na construção de árvore filogenética e no desenho de <i>primers</i>.....</p>	16
<p>Figura 3. Painel de imagens de discos foliares da variedade comercial SP80-3280: estágios de T0 a T70 do cultivo <i>in vitro</i>. A partir do estágio T30 notou-se a formação de calos embriogênicos compactos e lisos. As setas pretas apontam para regiões com a presença de calos e as barras brancas representam 1 cm. T0: 0 dias; T7: 7 dias; T14: 14 dias; T30: 30 dias; T40: 40 dias; T55: 55 dias e T70: 70 dias de cultivo <i>in vitro</i>.....</p>	20
<p>Figura 4. Calos não embriogênicos da variedade comercial SP80-3280 com aspecto friável e mucilaginoso formados a partir do estágio T30 do cultivo <i>in vitro</i> de cana-de-açúcar. A seta indica a presença de CNE esbranquiçados de aspecto endurecido. As barras representam 1 cm. T0: 0 dias; T7: 7 dias; T14: 14 dias; T30: 30 dias; T40: 40 dias; T55: 55 dias e T70: 70 dias de cultivo <i>in vitro</i>.....</p>	20
<p>Figura 5. Resultado de pesquisa BLAST na plataforma do SUCEST-FUN referente à sequência SP803280WUS1. A seta indica o resultado alinhamento ($score \geq 200$) e o retângulo indica as mesmas sequências com <i>e-value</i> zero.....</p>	22

Figura 6. Árvore filogenética de proteínas de WUSCHEL em cana-de-açúcar, *Arabidopsis thaliana* e diversas espécies de Poaceae. At: *Arabidopsis thaliana*; Sb: *Sorghum bicolor*; SP803280: SP80-3280; Sspont: *Saccharum spontaneum*; Zm: *Zea mays*; Ph: *Panicum hallii*; Si: *Setaria itálica*; Os: *Oryza sativa*; Ob: *Oryza brachyanta*; Do: *Dichanthelium oligosanthos*; Ta: *Triticum aestivum*; As: *Aegilops speltoides*; Hv: *Hordeum vulgare*; Bd: *Brachypodium distachyon*; Sp: *Stipa purpurea*; Atauschii: *Aegilops tauschii*..... 25

Figura 7. Árvore filogenética de proteínas de VIVIPAROUS1 em espécies de Poaceae. Sb: *Sorghum bicolor*; SP803280: SP80-3280; Sspont: *Saccharum spontaneum*; Zm: *Zea mays*; Ph: *Panicum hallii*; Si: *Setaria itálica*; Os: *Oryza sativa*; Do: *Dichanthelium oligosanthos*; Bd: *Brachypodium distachyon*..... 26

Figura 8. Árvore filogenética de proteínas de AGAMOUS-LIKE em espécies de Poaceae. Sb: *Sorghum bicolor*; SP803280: SP80-3280; Sspont: *Saccharum spontaneum*; Zm: *Zea mays*; Ph: *Panicum hallii*; Si: *Setaria itálica*..... 27

Figura 9. Árvore filogenética de proteínas de LEAFY-COTYLEDON em espécies de Poaceae. Sb: *Sorghum bicolor*; SP803280: SP80-3280; Sspont: *Saccharum spontaneum*; Zm: *Zea mays*; Ph: *Panicum hallii*; Si: *Setaria itálica*; Os: *Oryza sativa*; Do: *Dichanthelium oligosanthos*; Bd: *Brachypodium distachyon*; Atauschii: *Aegilops tauschii*; Bn: *Brassica napus*..... 28

Figura 10. Árvore filogenética de proteínas de BABYBOOM em *Arabidopsis thaliana* e diversas espécies de Poaceae. At: *Arabidopsis thaliana*; Sb: *Sorghum bicolor*; SP803280: SP80-3280; Sspont: *Saccharum spontaneum*; Zm: *Zea mays*; Ph: *Panicum hallii*; Si: *Setaria itálica*; Os: *Oryza sativa*; Do: *Dichanthelium oligosanthos*; Atauschii: *Aegilops tauschii*..... 30

ANÁLISES *IN SILICO* DE GENES ASSOCIADOS À EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM CANA-DE-AÇÚCAR

Autor: VICTOR RAMOS CAVALCANTE

Orientadora: Profa. Dra. MONALISA SAMPAIO CARNEIRO

RESUMO

A embriogênese somática indireta (ESI) é uma das vias de regeneração mais utilizadas na obtenção de plantas geneticamente modificadas em cana-de-açúcar. Genes reguladores da ESI vem sendo amplamente estudados em plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas, e agem como ativadores da expressão de cascatas gênicas ou promotores de crescimento e diferenciação celular do explante. Em contrapartida, em cana-de-açúcar há poucos relatos na literatura com esses genes envolvidos na ESI. Assim, o presente estudo visou: i) buscar genes homólogos putativos responsáveis pela regulação da ESI (famílias: BABYBOOM, WUSCHEL, LEAFY COTYLEDON, VIVIPAROUS1 e AGAMOUS-LIKE) em cana-de-açúcar (SP80-3280 e *Saccharum spontaneum*); ii) analisar a filogenia entre as sequências de aminoácidos de cana-de-açúcar e seus homólogos em *Arabidopsis thaliana* e espécies de Poaceae; iii) desenhar *primers* ideais para estudo de expressão gênica de genes relacionados à ESI de cana-de-açúcar. Foram realizadas pesquisas BLAST e BLASTp nos bancos de dados do Phytozome, NCBI, UniProt e Gramene para a obtenção de sequências homólogas das cinco famílias gênicas em milho, sorgo, arroz e *A. thaliana*. Desse modo, análises filogenéticas de sequências de aminoácidos foram realizadas com o auxílio dos *softwares* CLUSTALW e MEGAX, que apontaram proximidade evolutiva entre as proteínas de *Zea mays*, *Sorghum bicolor*, *S. spontaneum* e SP80-3280 em todos os genes estudados. As análises *in silico* indicaram que podem ter mais de um gene das famílias BABYBOOM, WUSCHEL E VIVIPAROUS1 regulando as vias da ESI em cana-de-açúcar. Além disso, com auxílio do *software* PRIMER3, foram obtidos 8 pares de *primers* com parâmetros ideais para serem utilizados em futuras análises de expressão gênica para compreender mais profundamente os mecanismos da ESI.

Palavras-chave: *Saccharum*, filogenia, fatores de transcrição, cultura de tecidos

IN SILICO ANALYSIS OF GENES ASSOCIATED WITH SOMATIC EMBRYOGENESIS IN SUGARCANE

Author: VICTOR RAMOS CAVALCANTE

Adviser: Prof. Dr. MONALISA SAMPAIO CARNEIRO

ABSTRACT

Indirect somatic embryogenesis (ISE) is one of the most used regeneration pathways to obtain sugarcane genetically modified plants. ISE regulatory genes have been widely studied in monocotyledonous and dicotyledonous plants, and act as activators of the expression of gene cascades or promoting cell growth and differentiation. In contrast, in sugarcane, there are few reports in the literature with these genes involved in ISE. Thus, the present study aimed to i) search for putative homologous genes responsible for the regulation of ISE (families: BABYBOOM, WUSCHEL, LEAFY COTYLEDON, VIVIPAROUS1, and AGAMOUS-LIKE) in sugarcane (SP80-3280 and *Saccharum spontaneum*); ii) analyze the phylogeny between the sugarcane amino acid sequences and their homologous in *Arabidopsis thaliana* and Poaceae species; iii) design ideal primers for studying the expression of sugarcane ISE-related genes. BLAST and BLASTp searches were carried out in the Phytozome, NCBI, UniProt, and Gramene databases to obtain homologous sequences of the five gene families in corn, sorghum, rice, and *A. thaliana*. Thus, phylogenetic analyzes of amino acid sequences were performed with the aid of the software CLUSTALW and MEGAX, which showed evolutionary proximity between the proteins of *Zea mays*, *Sorghum bicolor*, *S. spontaneum*, and SP80-3280 in all the studied genes. In silico analyzes indicated that they may have more than one gene from the BABYBOOM, WUSCHEL, and VIVIPAROUS1 families regulating the pathways of ISE in sugarcane. In addition, with the aid of the PRIMER3 software, 8 pairs of primers with ideal parameters were obtained to be used in future analyzes of gene expression to understand more deeply the mechanisms of ISE.

Keywords: *Saccharum*, phylogeny, transcription factors, tissue culture

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma planta semi-perene presente em regiões de clima tropical e subtropical e pertencente à família Poaceae, subfamília Panicoideae, tribo Andropogoneae, subtribo Saccharinae e gênero *Saccharum*. As principais espécies que compõem este gênero e que contribuíram para formação do complexo *Saccharum* são: *S. spontaneum* L., *S. robustum*, *S. officinarum*, *S. barberi*, *S. sinense* e *S. edule*. (DANIELS; ROACH, 1987; CARNEIRO et al; 2016). Os híbridos modernos são resultantes do cruzamento entre as espécies *S. officinarum*, por possuir alelos relacionados com alto acúmulo de açúcares, e *S. spontaneum* devido à alta tolerância a vários fatores de estresse bióticos e abióticos (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al, 2011; PARK; DA SILVA, 2016; PIPERIDIS; D'HONT, 2020).

Essa cultura é responsável por cerca de 80% do açúcar *in natura* produzido no mundo, além de sua importância na produção de biocombustíveis, em razão da capacidade das espécies e híbridos em acumularem biomassa (ROTT, 2018). No Brasil, para a safra 2020/2021, é esperada uma produtividade de 624.069,7 milhões toneladas de cana-de-açúcar, com cerca de 39,3 milhões de toneladas de açúcar e 30,6 bilhões de litros de etanol (CONAB, 2020). Os programas de melhoramento clássicos contribuíram com o lançamento de variedades de cana-de-açúcar com alta produtividade, alto conteúdo de açúcares nos colmos, resistência a doenças e outras características de interesse comercial (MING et al, 2006).

Ao adotar métodos de melhoramento clássicos, uma única variedade de cana pode levar de 10 a 14 anos para ser aprovada e lançada no mercado (BUTTERFIELD; THOMAS, 1996). Além disso, a cana-de-açúcar possui um genoma complexo em virtude de sua natureza poliploide, inclusive com ocorrências de aneuploidia, o que torna o melhoramento genético laborioso, complicado e demorado (HENRY; KOLE, 2010; ARRUDA, 2012; SOUZA et al, 2019). A dificuldade da obtenção de genótipos superiores com características específicas através dos métodos convencionais de melhoramento tem limitado o rendimento na produção de cana-de-açúcar, já que altos patamares de ganhos na produção açúcar e colmos vem sendo atingidos nos últimos anos (HOTTA et al, 2010). Desse modo, a adoção de ferramentas biotecnológicas, como a obtenção de transgênicos, é considerada uma alternativa viável para gerar variedades mais produtivas e adaptadas à demanda do mercado (DAL-BIANCO et al, 2012; NERKAR et al, 2018; ROOT, 2018). Também poderá ser uma maneira de enfrentar o desafio das mudanças climáticas e a necessidade de produzir alimentos suficientes para uma população em rápido crescimento (ALTPETER et al, 2016).

O cultivo *in vitro* é um dos pré-requisitos no processo de transformação genética visando à obtenção de plantas geneticamente modificadas (ROTT, 2018). As plantas submetidas à cultura de tecidos, podem assumir a embriogênese somática direta ou indireta como via de regeneração (MUSTAFA et al, 2018), sendo a forma indireta a mais utilizada em estudos com cana-de-açúcar (TAPARIA et al, 2012). A embriogênese somática (ES) é um processo genótipo-específico (GILL et al, 2004; SNYMAN et al, 2011) que necessita de adaptações de protocolos e metodologias para estudos com diferentes variedades (SILVEIRA et al, 2013).

Apesar de existirem diversos relatos de várias espécies de plantas acerca da expressão e a identificação de famílias gênicas relacionadas com a ESI, em cana-de-açúcar ainda há poucos estudos que descrevam esses genes. Portanto, são necessários mais estudos que possibilitem compreender melhor os mecanismos e genes que controlam a ESI em cana-de-açúcar. O presente estudo poderá auxiliar na otimização da ESI em *Saccharum* spp., tanto pela manipulação da expressão do gene de forma a favorecer a indução, quanto pelo estabelecimento de marcadores moleculares que auxiliem na seleção de variedades com maior potencial embriogênico. Além disso, este estudo poderá ajudar na melhoria do processo de obtenção de transgênicos de cana e na aplicação na edição de genomas, no intuito

de promover maior desenvolvimento embriogênico das variedades de cana-de-açúcar, em especial as recalcitrantes.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O presente estudo visou identificar no genoma de cana-de-áçúcar (SP80-3280) genes e proteínas das famílias gênicas BABYBOOM (BBM), WUSCHEL (WUS), LEAFY COTYLEDON (LEC), VIVIPAROUS1 (VP1) e AGAMOUS-LIKE (AGL) associadas ao processo de embriogênese somática.

2.2 Específicos

- Construir árvores filogenéticas a partir de sequências de aminoácidos identificadas em cana-de-açúcar e suas proteínas homólogas em outras espécies de Poaceae;
- Construir e caracterizar um painel de imagens da morfologia dos calos em SP80-3280 ao longo de 70 dias de cultivo *in vitro*;
- Desenhar *primers* de WUS, BBM, AGL, LEC e VP1 para SP80-3280 ideais para estudos de RT-qPCR.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Cultura de tecidos

A cultura de tecidos é uma ferramenta utilizada para propagar variedades comerciais de cana-de-açúcar em alta escala, produzir plantas livres de doenças e pragas, conservar germoplasma e como parte das técnicas de transformação genética (SNYMAN et al, 2011; ROOT, 2018). Na cultura *in vitro* é necessário a elaboração de meios de cultura que possam suprir as necessidades nutricionais das plântulas. Em vista disso, na literatura são reportadas diversas formulações comumente utilizadas. O meio de cultura mais utilizado é conhecido como MS e foi desenvolvido por Murashige and Skoog (1962). Este meio contém macro e micronutrientes em concentrações ajustadas para ser suficiente e garantir um bom crescimento e desenvolvimento das plantas *in vitro* (THORPE, 2007; SAAD; ELSHAHED, 2012).

A fonte de carbono adicionada aos meios de cultura é um importante fator para garantir a indução e desenvolvimento das plântulas. Entretanto o tipo de fonte a ser utilizada varia em função do estágio de desenvolvimento e do genótipo utilizado na cultura de tecidos. Existe uma vasta gama de açúcares metabolizados pelas plantas como: hexoses de monossacarídeos, pentoses, dissacarídeos, trissacarídeos e alcoóis de açúcar, que podem ser usados nos meios de cultivo. Por essa razão, é indispensável determinar a influência de cada fonte de carbono em diferentes espécies e genótipos, assim como sua concentração adequada. Assim,

se a fonte de carbono for utilizada de maneira inapropriada, pode causar desordens fisiológicas que afetam a adequada morfogênese vegetal (YASSEN et al, 2013). Com o passar dos anos a sacarose se tornou um dos carboidratos mais comumente adicionados aos meios de cultura em estudos *in vitro*, inclusive em cana-de-açúcar (MURASHIGE; SKOOG, 1962; LIU, 1993; CHENGALRAYAN; GALLO-MEAGHER, 2001; DESAI et al, 2006; ALCANTARA et al, 2014; FERREIRA et al, 2017).

Outro importante elemento relacionado à composição dos meios de cultura são os fitorreguladores de crescimento, que variam em quantidade e tipo de acordo com o resultado a ser alcançado pelo estudo *in vitro*. Os fitohormônios podem ser de diferentes classes como: giberelinas, etileno, ácido abscísico, brassinosteróides, poliaminas e, os mais utilizados, auxinas e citocininas. As auxinas são uma classe de substâncias naturais ou sintéticas responsáveis pela alongação celular, indução de brotos, inibição de raízes e regulação da dominância apical (TAIZ; ZEIGER, 2013). No cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar, o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é o auxina que confere os melhores resultados (HO; VASIL, 1983; PASTERNAK et al, 2002; SHAHZAD et al, 2017). Alcantara et al (2014) estudaram a regeneração *in vitro* das variedades RB855156 e RB72454 com adição de diferentes concentrações e tipos de auxinas ao meio de cultura. Os autores concluíram que o melhor regulador de crescimento foi o 2,4-D na concentração de 13,5 μM , a qual proporcionou as maiores médias de indução de calos em ambas variedades.

Além das auxinas, outra classe de fitorreguladores amplamente utilizados são as citocininas, que estão relacionadas com a proliferação celular, quebra da dominância apical e desenvolvimento vascular (TAIZ; ZEIGER, 2013). Em um experimento avaliando os efeitos da interação de duas citocininas distintas, cinetina e 6-Benzilaminopurina (BAP), na propagação *in vitro* dos genótipos C86-12 e C86-56, Shimells et al (2014) demonstraram que a combinação de 1,5 mgL^{-1} de BAP com 0,5 – 1,0 mgL^{-1} de cinetina em meio MS proporcionou os melhores resultados para a multiplicação *in vitro* de plântulas. Em adição, Taiz e Zeiger (2013) pontuaram que manter uma alta relação auxina:citocinina afeta a morfogênese dos tecidos, visto que estimula a formação de raízes, enquanto que uma baixa relação promove o desenvolvimento foliar. Em contrapartida, valores intermediários dessa relação, promovem a formação de massas de células indiferenciadas conhecidas como calos (TAIZ; ZEIGER, 2013).

A cultura de tecidos de cana pode ser realizada com explantes de diferentes

porções meristemáticas, como o meristema apical (JAHANGIR et al, 2014), folhas imaturas (SHANKAR et al, 2018), inflorescências pré-emergentes (JOSHI et al, 2013) e gemas axilares (CHEONG et al, 2012). A regeneração dos explantes e a formação de plântulas ocorrem usualmente através de duas vias distintas, organogênese ou embriogênese somática, que podem ser de maneira direta ou indireta, as quais já possuem protocolos bem estabelecidos (SNYMAN et al, 2011). Lakshmanan et al (2006) realizaram um experimento *in vitro* com híbridos interespecíficos de cana-de-açúcar com a finalidade de comparar alguns aspectos da cultura de tecidos que podem incrementar essa técnica. Os autores concluíram que a polaridade, orientação, tamanho, estágio de desenvolvimento, genótipo e a concentração de fitorreguladores são fatores determinantes no potencial de regeneração dos explantes. Desse modo, discos foliares com tamanho entre 1 e 2 mm de espessura, provenientes de porções mais próximas do meristema apical e com a face distal em contato com o meio de cultura são mais eficientes na organogênese e embriogênese somática diretas de cana-de-açúcar. Além disso, altas concentrações de fitoreguladores podem causar efeitos inibitórios no crescimento e desenvolvimento de calos e plântulas.

Joshi et al (2013) realizaram um experimento a fim de encontrar um método eficaz de organogênese direta usando 3 genótipos diferentes (CP84-1198, CP88-1762 e CP89-2143). Nesse estudo, os autores concluíram que o uso de discos foliares imaturos próximos do meristema apical e inseridos horizontalmente com a face distal em contato com o meio de cultura é a melhor configuração para regenerar cana-de-açúcar *in vitro*. Esses resultados corroboram com os dados obtidos anteriormente por Lakshmanan et al (2006). A combinação de vários fatores é determinante para criar ou escolher um protocolo útil e eficiente para a cultura *in vitro* de cana-de-açúcar. Em razão disso, deve-se levar em consideração que diferentes genótipos e explantes requerem formulações específicas dos meios de cultura e métodos para aplicar as técnicas de cultura de tecidos.

3.2 Vias de regeneração

Dentre as vias de regeneração utilizadas na cultura de tecidos vegetais temos a organogênese e embriogênese. Em ambas as vias, o processo de regeneração pode ser direto (sem a fase de calogênese) ou indireto (formação de calos). Snyman et al (2011) resumiram que a organogênese é caracterizada por

regenerar brotos a partir do meristema apical ou folhas imaturas (palmito), sem a formação de embriões, devido à alta taxa citocinina:auxina. A embriogênese somática é a via mais utilizada e consiste na regeneração de plantas a partir de embriões somáticos formados em razão da adição de auxinas no meio de cultura (LAKSHMANAN et al, 2005; SNYMAN et al, 2011).

A embriogênese somática (ES) pode ser dividida em duas vias: i) direta (ESD) e, ii) indireta (ESI), que consiste na formação de calos como uma fase intermediária entre a inoculação dos explantes e a formação de embriões (MUSTAFA et al, 2018). A ESI é considerada a via de regeneração mais eficiente para ser aplicada em protocolos de obtenção de cana-de-açúcar geneticamente modificada (TAPARIA et al, 2012).

ESI promove a formação de dois tipos diferentes de calos, embriogênicos e não-embriogênicos, os quais possuem diferentes composições bioquímicas que podem tomar diferentes funções na regulação da ES (MAHMUD et al, 2015). Além disso, esse fenômeno envolve uma série de eventos peculiares, como mudanças nos padrões fisiológicos, metabólicos e de expressão gênica, além de desdiferenciação e divisão celular (PATHAK; HAMZAH, 2008; YANG; ZHANG, 2010). A ESI pode ser dividida em duas etapas: i) indução, que ocorre na presença de fitoreguladores de crescimento e consiste na aquisição de competência embriogênica pelas células somáticas, tornando-se células embriogênicas e; ii) expressão, que começa a partir da remoção dos fitoreguladores de crescimento, permitindo demonstrar a competência embriogênica dos explantes, que irão se diferenciar em embriões somáticos (JIMENEZ; BANGERTH, 2001; NAMASIVAYAM, 2007; BRAYBOOK; HARADA, 2008).

Ho e Vasil (1983) estudando a ESI de *S. officinarum*, descobriram que 4 dias após o início da cultura de tecidos ocorreu a formação de calos na face abaxial do explante. Entre 2 e 3 semanas, ocorreu a formação de calos compactos com desdiferenciação em embrióides, a qual se tornou mais definida entre 30 e 55 dias da cultura *in vitro*. Em adição, neste artigo, os resultados indicaram que a melhor concentração de 2,4-D para formar calos e massa fresca variou entre 0,5 e 1,5 mg/L. Existem dois fatores que são responsáveis por ativar a competência embriogênica: fitoreguladores de crescimento e o estresse oxidativo, que reprogramam a expressão gênica, controlando o processo de ES (ZAVATTIERI et al, 2010). Ho e Vasil (1983) e Guiderdoni e Demarly (1988) caracterizaram que a

formação e desenvolvimento de embriões em cana-de-açúcar ocorrem a partir de pequenas células únicas com paredes finas, compactadas, ricas em citoplasma com muitos vacúolos e grãos de amido.

Segundo Guiderdoni e Demarly (1988), aos seis dias de cultivo *in vitro*, as células ao redor do feixe vascular dos discos foliares começam a se proliferar formando camadas concêntricas, tendo o centro mitótico restrito ao parênquima do floema, o que pode indicar o início da formação dos calos. Nesse mesmo estudo, aos 3 meses de cultivo *in vitro*, os calos apresentaram estruturas embriogênicas bem diferenciadas com clara organização bipolar dos eixos apicais e radiculares. Entretanto, a razão pela qual ocorre a transição de células somáticas para desdiferenciadas e totipotentes é desconhecida (DE-LA-PENA et al, 2015). Por esse motivo, existe escassez de estudos que exploram esses mecanismos em cana-de-açúcar, visto que é um processo genótipo-específico (GILL et al, 2004; SNYMAN et al, 2011) e necessita de adaptações de protocolos para estudos com diferentes variedades (SILVEIRA et al, 2013).

3.3 Genes associados à embriogênese somática

A identificação de genes associados à embriogênese somática (ES) representa um importante aspecto no entendimento acerca dos processos de interação genética em virtude das vias de sinalização e regulação das respostas no cultivo *in vitro* (CARVALHO et al, 2006).

Inúmeros genes reportados estão envolvidos no processo de expressão gênica durante a ESI em espécies vegetais. Boutilier et al (2002) identificou o gene BABYBOOM (BBM) em cultura de *Brassica napus*, relacionando-o com o estímulo à proliferação celular e morfogênese. Tal gene faz parte da família de fatores de transcrição (FT) AIL (AINTEGUMENTA-like) (HORSTMAN et al, 2014) e codifica o FT AP2/ERF, responsável pela regulação de outros genes também relacionados com o processo embriogênico (PASSARINHO et al, 2008). Também foi relatado que, quando em superexpressão, o gene induz a formação de calos embriogênicos e de embriões somáticos, dispensando a adição de reguladores em *A. thaliana* e *B. napus* (BOUTILIER et al, 2002). BBM também foi estudado por Florez et al (2015) em cacau a partir de diferentes estágios do desenvolvimento de embriões: i) globular, ii) cordiforme, iii) torpedo inicial, iv) torpedo tardio e v) maduro. Constatou-se que os níveis de expressão do gene foram superiores em todos os estágios da

ES quando comparados com a zigótica, sendo assim, considerado um biomarcador da ES. O estudo indica aumento nos níveis de expressão quando os embriões estão em estágio globular. Além disso, a expressão desse fator de transcrição é maior em calos indiferenciados associados à tecidos que produzem embriões do que quando associados à tecidos em que não há produção de embriões.

A função do gene WUSCHEL (WUS) foi estudada por Zuo et al (2002) em *Arabidopsis* e foi relatada como um mecanismo chave na embriogênese, promovendo a transição do estágio vegetativo para o embriogênico e na manutenção da identidade das células embriogênicas. Bouchabké-Coussa et al (2013) promoveram a superexpressão do gene WUS em calos de *Gossypium hirsutum* L. e observaram que houve uma formação três vezes maior de tecido embriogênico nesses calos do que em relação ao tratamento controle, que possuía expressão padrão do gene WUS. Lowe et al (2016) avaliaram a transformação genética em plantas recalcitrantes de monocotiledôneas. O estudo constatou que os genes BBM e WUS2 quando inseridos no T-DNA de um vetor de transformação, estimularam o crescimento do tecido embriogênico, permitindo que o processo de transformação via *Agrobacterium* tenha obtido uma maior frequência de plântulas transformadas de *S. bicolor*, *S. officinarum* e *Oryza sativa*. Em relação ao mesmo estudo, Yin et al (2017) reiteram que essa abordagem é genótipo independente e que a otimização desse processo, juntamente com a identificação de mais genes, poderá permitir que outros estudos consigam tornar mais eficiente a transformação e edição do genoma das plantas.

Outros genes que possuem papéis na regulação e indução da ESI são o LEAFY COTYLEDON (LEC) e LEAFY COTYLEDON-LIKE (L1L), que estão relacionados com a aquisição de competência embriogênica, formação, desenvolvimento dos embriões, morfogênese, diferenciação celular e ativação de outros genes essenciais (ROCHA; DORNELAS; 2013). O gene VIVIPAROUS1 (VP1) promove o desenvolvimento e maturação do embrião (UDDENBERG et al, 2011). Segundo Shivani et al (2017), esse gene é altamente expresso em calos de banana, porém Gruszczynska e Rakoczy- Trojanowska (2011) sugeriram em seu estudo que, em centeio, os genes homólogos de VP1 e LEC podem causar efeitos negativos na formação de calos embriogênicos, pois podem agir como ativadores ou repressores de outros genes (SUZUKI et al, 1997).

Zhai et al (2016) reportaram que FT da família AGAMOUS-LIKE (AGL) são responsivos a hormônios vegetais e podem estar associados à ESI em rabanete. Em um estudo anterior com *A. thaliana* e *Glycine* sp., Thakare et al (2008) observaram que a perda de função de genes homólogos de AGL ocasionou uma diminuição na frequência de formação de embriões somáticos, e sua superexpressão causou o aumento do desenvolvimento dos embriões. Foram encontradas, ainda, outras famílias que também possuem relação com a embriogênese somática de plantas, por exemplo, o gene BOLITA (BOL), que está relacionado com os FT AP2/ERF. Tal gene promove a proliferação e expansão celular e, quando superexpressado em *A. thaliana*, afeta a diferenciação celular e induz a formação de calos a partir de explantes radiculares (MARSCH-MARTINEZ et al, 2006).

Shivani et al (2017) avaliaram famílias de FT (BABYBOOM , WUSCHEL, BSD, LEAFY COTYLEDON, LEAFY COTYLEDON LIKE, VIVIPAROUS1, CUP SHAPED COTYLEDONS, BOLITA e AGAMOUS LIKE) associados à ESI em *Musa* spp. Os autores encontraram 18 genes a partir de calos embriogênicos e, dentre esses genes, quatro tiveram sua expressão aumentada com a adição de 2,4-D ao meio de cultura. Além disso, esse estudo sugeriu que o gene homólogo de LEC (*MaLEC2*) em banana pode desempenhar papel no desenvolvimento de calos não-embriogênicos. Ademais, os genes homólogos de BBM (*MaBBM2*) e WUS (*MaWUS2*) foram os mais promissores na regulação na ESI em banana. Por isso o estudo aponta a necessidade de mais investigações com esses genes para que a ESI possa ser melhor compreendida. Esses homólogos encontrados em cultura de banana por Shivani et al (2017) foram expressos a partir da utilização de reguladores de crescimento durante o cultivo dos calos, podendo estar relacionados com a fase de indução da ES. Segundo Pulianmackal et al (2014), a reprogramação das células para aquisição de competência embriogênica ocorre por meio da adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Foi utilizada a variedade comercial de cana-de-açúcar SP80-3280, com 8 meses de idade, coletada do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos (CCA UFSCar) em Araras - SP (latitude 22°18'S, longitude 47°23'W e altitude de 707m). Esse genótipo foi escolhido porque é amplamente usado como variedade-modelo em estudos *in vitro* e de prova de genes. Além disso, a variedade SP80-3280 teve seu genoma sequenciado (SOUZA et al, 2019) e é utilizada em estudos de perfil de transcriptoma (DE MELLO et al, 2020) e mapas genéticos. Em ambiente laboratorial, os ponteiros das canas tiveram suas folhas maduras retiradas e segmentos de cerca de 15 cm (palmitos) a partir do meristema apical foram usados para introdução *in vitro* (Figura 1-A). Em seguida, os palmitos foram submetidos a um processo de assepsia, que consistiu em duas lavagens com álcool 70% durante cerca de 1 minuto e 3 enxágues com água desmineralizada autoclavada. Então, os palmitos foram mantidos em frascos previamente autoclavados (Figura 1-B) e levados à câmara de fluxo laminar para introdução *in vitro* (Figura 1-C).



Figura 1: Inoculação de explantes da variedade comercial SP80-3280: A) palmitos de cana; B) assepsia dos palmitos em frascos com álcool 70%; C) inoculação e secção dos discos foliares em fluxo laminar e D) placa de Petri com discos foliares em meio MS3k sólido.

4.2 Cultivo *in vitro*

4.2.1 Meio de cultura

O meio de cultura para a indução da calogênese foi o MS3K sólido, que foi composto pela formulação do meio MS basal (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 3 mg/L de 2,4-D (ácido-2,4-diclorofenoxiacético), 0,5 mg/L de cinetina, 30 g/L de sacarose, 150 mg/L de ácido cítrico e 2,3 g/L de Phytigel. Os componentes foram misturados com o auxílio de agitador magnético e tiveram seu pH ajustado para 5,8, utilizando pHmetro digital de bancada. Em seguida, o meio foi distribuído em frascos de 500mL e esterilizados em autoclave a 121°C e 1 atm durante 20 minutos. Após a esterilização, em câmara de fluxo laminar, aproximadamente 25mL de meio de cultura foram dispensados em placas de Petri previamente autoclavadas, as quais foram seladas com plástico filme para evitar qualquer tipo de contaminação. Antes da manipulação dos meios em câmara de fluxo laminar, a mesma passou por um processo de assepsia com álcool 70% e foi exposta à radiação UV durante 15 minutos para que os microrganismos presentes fossem eliminados.

4.2.2 Inoculação dos explantes

Os palmitos previamente esterilizados foram seccionados transversalmente em 5 discos foliares de aproximadamente 0,2 cm de espessura por 1 cm de diâmetro, com o auxílio de bisturi com lâmina de aço carbono número 10 da Solidor. Posteriormente, os discos foram inseridos em placas de Petri contendo solução de ácido cítrico (150 mg/L), usada como substância antioxidante. Com o auxílio de uma pinça de aço inox, os discos foliares foram retirados da placa com solução de ácido cítrico e colocados em papel filtro estéril para que o excesso de solução fosse absorvido. Os discos, então, foram inseridos com a porção abaxial em contato com o meio de cultura MS3K fresco contido em placas de Petri. Em seguida, as placas foram tampadas e lacradas com plástico filme (Figura 1-D). As placas foram mantidas em sala de crescimento na ausência de luz e temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 70 dias de cultivo *in vitro*.

Os discos foliares e calos foram repicados e transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura fresco em câmara de fluxo laminar a cada 3 semanas até completar 70 dias de cultivo. No processo de repicagem dos calos, foram contabilizados (%) e descartados quaisquer discos ou porções de segmentos que estivessem oxidados ou contaminados. Esse controle acerca da contaminação e oxidação do material vegetal foi realizado com o intuito de registrar que a introdução *in vitro* de explantes da cana-de-açúcar SP80-3280 se deu dentro dos padrões encontrados em outros estudos com cana-de-açúcar. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições compostas de 30 placas de Petri, e cada placa continha cinco discos foliares. Desse modo, cada repetição possuiu 150 discos.

4.2.3 Classificação de calos

Os calos obtidos durante o cultivo *in vitro* foram identificados em relação ao seu aspecto morfológico, baseado na classificação feita por Silveira et al (2013) e Heringer et al (2015), que consistiu em:

- a) Calos compactos e lisos: calos embriogênicos (CE);
- b) Calos friáveis e mucilaginosos: calos não embriogênicos (CNE).

4.2.4 Painel de imagens de SP80-3280

A criação de um painel de imagens de diferentes estágios da ES da variedade SP80-3280 foi realizada com o auxílio de câmera digital Canon PowerShot G10. No painel constaram imagens dos calos durante os períodos de 0, 7, 14, 30, 40, 55 e 70 dias de cultivo *in vitro* (T0, T7, T14, T30, T40, T55 e T70, respectivamente), os quais foram descritos morfológicamente. O painel de imagens possui a finalidade de servir como controle para comparar estágios morfológicos da ESI de cana-de-açúcar com futuras análises de expressão gênica nos mesmos tempos registrados nas imagens (T0 a T70).

4.3 Análise *in silico*

Nas análises *in silico* (Figura 2) cinco famílias gênicas de fatores de transcrição (FT) foram avaliadas: BABYBOOM (BBM), WUSCHEL (WUS), LEAFY COTYLEDON (LEC), VIVIPAROUS1 (VP1) e AGAMOUS-LIKE (AGL), baseadas no estudo de Shivani et al (2017). Foram utilizadas sequências gênicas e de aminoácidos de milho (*Z. mays*), arroz (*O. sativa*) e *A. thaliana* (planta modelo) encontradas através de pesquisas BLAST e BLASTP nas plataformas do NCBI (*National Center for Biotechnology Information* - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e UniProt (<http://www.uniprot.org/>). Essas sequências foram utilizadas como base de consulta para encontrar genes e proteínas homólogas em sorgo (*S. bicolor*) através de pesquisas no banco de dados do Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#>). Posteriormente, as sequências de sorgo foram inseridas em ferramentas de pesquisa da plataforma SUCEST-FUN (www.sucest-fun.org) para encontrar putativas sequências CDS (*coding sequences*) e de aminoácidos de cana-de-açúcar (SP80-3280 e *S. spontaneum*) (Tabela suplementar 3). As sequências CDS de SP80-3280 foram inseridas na ferramenta BLAST do SUCEST-FUN para avaliar o número de cópias gênicas, sendo consideradas como cópias as sequências que apresentaram *e-value* zero e *score* ≥ 200 no alinhamento.

Em relação à análise filogenética, foi realizada uma nova pesquisa por proteínas homólogas em espécies de Poaceae (*S. bicolor*, *Z. mays*, *O. sativa*, *Panicum halli*, *Setaria italica*, *O. brachyanta*, *Brachypodium distachyon*, *Dichanthelium oligosanthes*, *Triticum aestivum*, *Aegilopsis speltoides*, *Hordeum vulgare*, *Stipa purpurea*, *Aegilops tauschii* e *B. napus*). Assim, foram utilizadas

sequências de aminoácidos de cana-de-açúcar como sequências de consulta nas plataformas do NCBI, UniProt, Phytozome e Gramene (<http://www.gramene.org/>). Em seguida, todas as sequências de aminoácidos obtidas foram submetidas ao alinhamento múltiplo com o auxílio dos *softwares* CLUSTALW (versão 2.1) e CLUSTAL Omega (versão 2.1) (Figura 2). O resultado do alinhamento múltiplo foi utilizado na construção de árvores filogenéticas através do método de *neighbor-joining* com o software MEGA X (<https://www.megasoftware.net/>), através de 1000 *bootstrap*, *pairwise deletion* e *p-distance* como parâmetros para confiabilidade da árvore.

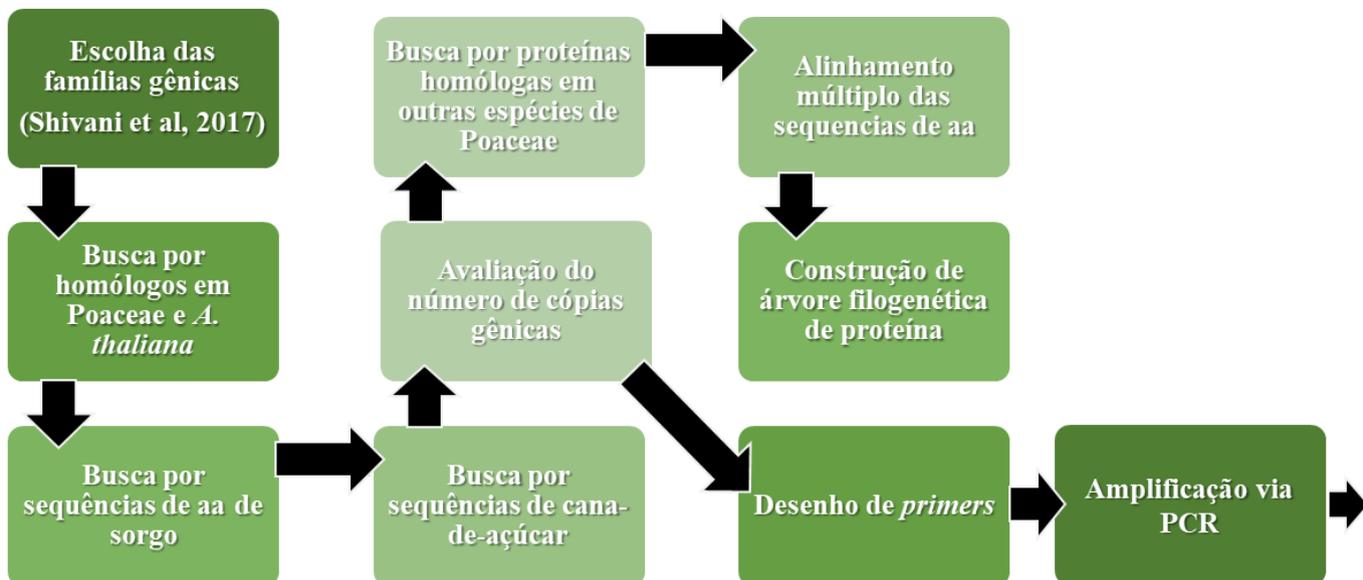


Figura 2: Etapas e metodologias empregadas na análise *in silico*, na construção de árvore filogenética e no desenho de *primers*.

4.4 Desenho de *primers*, extração de DNA e amplificação por PCR

Os exons das sequências CDS de SP80-3280 foram separados e utilizados para a construção dos pares de *primers* com o auxílio do *software* Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Foram definidos como critérios para obtenção do *primers*: amplicons entre 100 e 200 pb, tamanho de *primers* entre 15 e 20 nucleotídeos, temperatura de *Melting* entre 58°C e 62°C, porcentagem de GC entre 40 e 60% e os valores de dímeros e *hairpins* entre -5 e 0, baseado nos critérios estabelecidos por Correr et al (2020), com modificações. A avaliação da qualidade dos *primers* foi feita através do *software* Beacon Designer

(<http://www.premierbiosoft.com/>) (Figura 2).

Para verificar se os pares de *primers* desenhados foram complementares a regiões específicas do genoma da cana-de-açúcar foi realizada uma etapa de validação através de PCR. Para isso, o DNA genômico de discos foliares de SP80-3280 em T0 foi extraído com base na metodologia empregada por Ulhoa et al (2014). As amplificações foram realizadas em gradientes de temperatura de 53-55-57°C ou 61-62-63°C, de acordo com as temperaturas de *melting* informadas pelos *softwares* PRIMER3 e Beacon Designer. Os produtos das PCRs foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose (3%) a 150mV por 60 minutos. Em seguida, os géis foram mergulhados em solução de brometo de etídio por 10 minutos para marcação dos fragmentos de DNA e, levados à câmara com iluminação UV para registro de imagens com o auxílio da câmera digital Canon PowerShot G10.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Introdução *in vitro*

A contaminação por microorganismos (bactérias e fungos) ocorreu em 6,66% dos discos foliares de SP80-3280. A taxa de oxidação dos explantes foi observada em 20,66%, o que proporcionou um aproveitamento de 72,66% de discos saudáveis. Todos os explantes não contaminados foram responsivos à ES com a formação de CE ou CNE.

Os explantes coletados em diferentes tempos do cultivo *in vitro* apresentaram aspectos morfológicos distintos durante os 70 dias de cultivo (Figura 3). Em geral, o surgimento de calos foi observado a partir de T14. Entretanto só foi possível diferenciar entre CE e CNE a partir de T30 (Figuras 3 e 4). Além disso, devido à maior proliferação de células desdiferenciadas a partir do estágio T40, os discos precisaram ser desmembrados para que os calos tivessem mais espaço e continuassem seu desenvolvimento. Gill et al (2004) observaram que as variedades Co.J.83 e Co.J.86 apresentaram porcentagens acima de 90% na formação de calos a partir da ESI entre 8 e 12 dias após a introdução *in vitro*.

Os CE obtidos foram caracterizados como compactos, lisos e de coloração creme (82,6%), ao passo que CNE foram classificados como friáveis, mucilaginosos e levemente translúcidos (17,4%). Os CNE também apresentaram porções esbranquiçadas de aspecto endurecido (Figura 4). Alta porcentagem (95%) de CE também foi obtida por Gandonou et al (2004) ao avaliar a ESI das variedades de cana-de-açúcar NCo310, CP70-321 e CP65-357 após 4 semanas de cultivo *in vitro*.

Alguns fatores metabólicos podem estar relacionados com as diferenças morfológicas dos tipos de calos obtidos na ESI de cana-de-açúcar. Silveira et al (2013) avaliaram as diferenças morfológicas e de conteúdo de poliaminas entre CE e CNE de cana-de-açúcar (SP79-1011) durante a aquisição de competência embriogênica na ESI. A histomorfologia dos CE indicou que possuem formato arredondado, alta taxa núcleo/citoplasma, pequenos vacúolos, núcleo proeminente e estruturas globulares bem organizadas. Enquanto que CNE apresentam células dispersas e alongadas, com baixa relação núcleo/citoplasma e muitos vacúolos. Além disso, os autores observaram que os níveis endógenos de poliaminas foram maiores em CE, o que pode contribuir na aquisição da competência embriogênica. A aquisição da competência embriogênica acontece a partir da expressão de alguns genes das famílias LEC e AGL (ROCHA; DORNELAS, 2013). Assim, a expressão desses genes podem estar relacionadas com o acúmulo de poliaminas pelos calos.

Da mesma forma que acontece com as poliaminas, o acúmulo de outros tipos de metabólitos pode estar relacionado com a ESI e com a expressão de seus genes reguladores. Neves et al (2003) analisaram calos da variedade CP-5243 e notaram que CE possuem maior conteúdo de prolina livre, poliaminas, açúcares, invertases e cinco vezes mais proteínas solúveis do que em CNE. Sugere-se então que a atividade metabólica em CE é maior, o que pode ajudar nas vias da ESI. Mahmud et al (2015) compararam os perfis metabólicos de CE e CNE de cana-de-açúcar (CP 801743 e CP 841198). Os autores observaram que metabólitos como glicose, frutose, sacarose e alanina ocorreram em maior concentração em CE, enquanto que os conteúdos de asparagina, glutamina, lisina, colina e 2-hidroxiisobutirato foram maiores em CNE. Essa diferença nos perfis dos calos é um indicativo de que os diferentes metabólitos culminam em rotas metabólicas distintas durante os processos de ESI, o que também influencia na morfologia das células desdiferenciadas de CE e CNE.

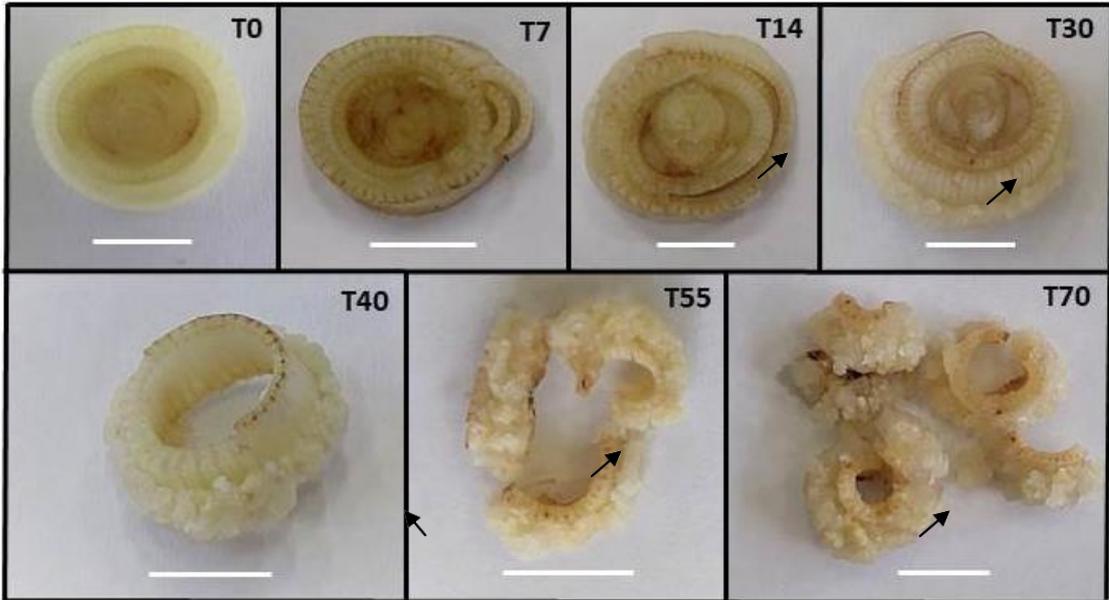


Figura 3: Pannel de imagens de discos foliares da variedade comercial SP80-3280: estágios de T0 a T70 do cultivo *in vitro*. A partir do estágio T30 notou-se a formação de calos embriogênicos compactos e lisos. As setas apontam para regiões com a presença de calos e as barras representam 1 cm. T0: 0 dias; T7: 7 dias; T14: 14 dias; T30: 30 dias; T40: 40 dias; T55: 55 dias e T70: 70 dias de cultivo *in vitro*.

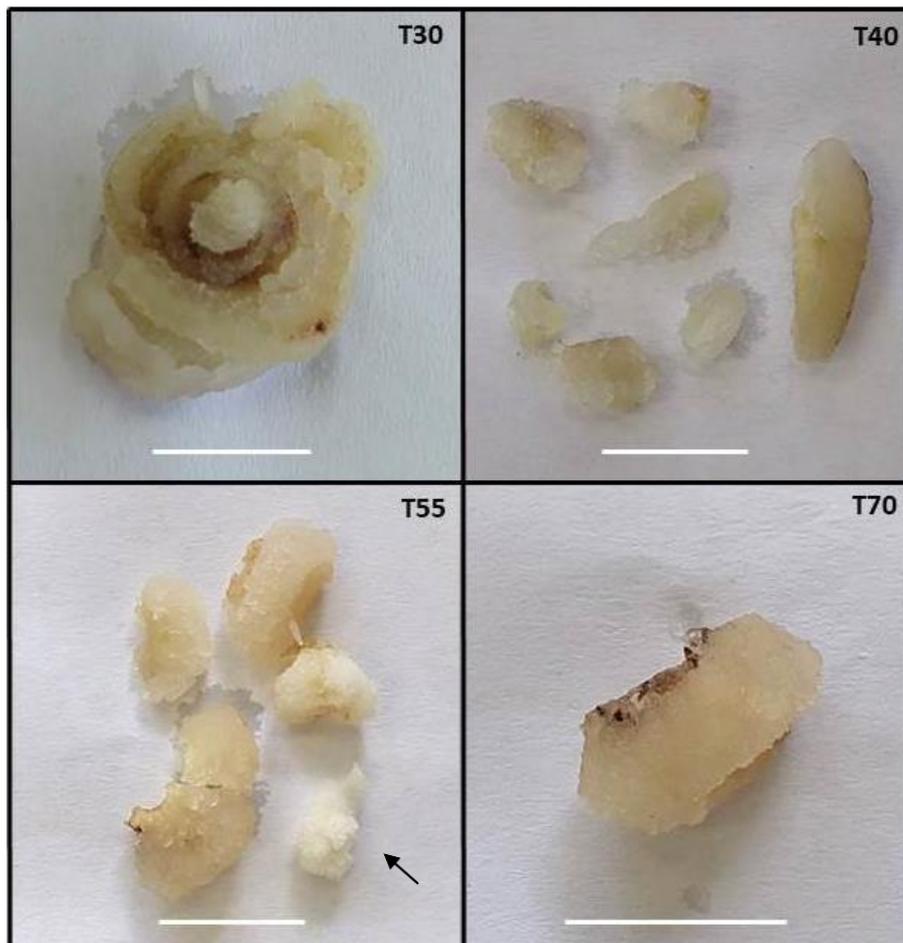


Figura 4: Calos não embriogênicos da variedade comercial SP80-3280 com aspecto friável e mucilaginoso formados a partir do estágio T30 do cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar. A seta indica a presença de CNE esbranquiçados de aspecto endurecido. As barras representam 1 cm. T0: 0 dias; T7: 7 dias; T14: 14 dias; T30: 30 dias; T40: 40 dias; T55: 55 dias e T70: 70 dias de cultivo *in vitro*.

5.2 Análise *in silico*

A partir de pesquisas nos bancos de dados do NCBI e UniProt, foram encontrados 21 seqüências de aminoácidos em *A. thaliana* (6), *Z. mays* (8) e *O. sativa* (7) para os genes das famílias BBM (7), WUS (8), VP1 (1), AGL (1) e LEC (4) (Tabela 1). Não foram encontradas proteínas homólogas de sorgo em ZmBBM2, OsBBM e AtWUS.

Tabela 1: Lista de acessos nos bancos de dados (NCBI e UniProt) utilizados como consulta para encontrar proteínas homólogas em *Sorghum bicolor* e outras espécies de gramíneas.

Famílias Gênicas	Nomenclatura	Espécie	Acesso	Fonte
BBM	AtBBM	<i>A. thaliana</i>	AF317907.1	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AF317907.1
	AtBBM	<i>A. thaliana</i>	AAM33803.1	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAM33803.1
	ZmBBM1	<i>Zea mays</i>	NP_001147535.1	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_001147535.1
	ZmBBM1	<i>Zea mays</i>	AQK72611.1	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AQK72611.1
	ZmBBM1	<i>Zea mays</i>	AQK72610.1	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AQK72610.1
	ZmBBM2	<i>Zea mays</i>	ACG29578.1	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ACG29578.1
	OsBBM	<i>O. sativa</i>	ABA92780.1	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ABA92780.1
WUS	AtWUS	<i>A. thaliana</i>	Q9SB92	http://www.uniprot.org/uniprot/Q9SB92
	AtWUS	<i>A. thaliana</i>	NP_565429.1	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_565429.1
	AtWOX2	<i>A. thaliana</i>	NM_125325	http://www.uniprot.org/uniprot/Q6X7K1
	OsWUS	<i>O. sativa</i>	AB218894.1	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AB218894.1?report=genbank
	OsWOX1B	<i>O. sativa</i>	Q33DK0	http://www.uniprot.org/uniprot/Q33DK0
	OsWOX1A	<i>O. sativa</i>	Q7XM13	http://www.uniprot.org/uniprot/Q7XM13
	ZmWOX3A	<i>Zea mays</i>	Q70UV1	http://www.uniprot.org/uniprot/Q70UV1
	ZmWOX3B	<i>Zea mays</i>	Q6S3I3	http://www.uniprot.org/uniprot/Q6S3I3
VP1	ZmVP1	<i>Zea mays</i>	P26307	http://www.uniprot.org/uniprot/P26307
AGL	AtAGL62	<i>A. thaliana</i>	Q9FKK2	http://www.uniprot.org/uniprot/Q9FKK2
LEC	ZmLEC1	<i>Zea mays</i>	AF410176	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AF410176
	OsLEC1	<i>O. sativa</i>	AY264284.1	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AY264284.1
	OsLEC1B	<i>O. sativa</i>	AY062184	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AY062184.1
	OsLEC1A	<i>O. sativa</i>	AY062183.1	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AY062183.1

No genoma de *S. bicolor*, foram encontradas 7 seqüências putativas de aminoácidos de WUS, 3 de BBM, 3 de VP1, 1 de LEC e 1 de AGL. Essas seqüências de aminoácidos de sorgo foram utilizadas como base para buscar proteínas putativas de *S. spontaneum* e SP80-3280 através do SUCEST-FUN. Desse modo, foram encontradas: a) BBM: 4 seqüências para SP80-3280 e 5 seqüências para *S. spontaneum*; b) WUS: 7 seqüências para SP80-3280 e 7 seqüências para *S. spontaneum*; c) VP1: 3 seqüências para SP80-3280 e 6 seqüências para *S. spontaneum*; d) AGL: 1 seqüência para SP80-3280 e 1 seqüência para *S. spontaneum*; e) LEC: 1 seqüência para SP80-3280 e 1 para *S. spontaneum*. Em seguida, foram utilizadas as ferramentas BLAST e BLASTP do SUCEST-FUN para obter as respectivas seqüências de nucleotídeos

correspondentes às proteínas anteriormente encontradas (Tabela suplementar 3).

A análise de cópias gênicas indicou que as sequências gênicas putativas de WUS apresentaram até 13 cópias gênicas (Tabela suplementar 1). Em contrapartida, ainda em WUS, a sequência SP803280WUS1 apresentou 2 possíveis cópias (Figura 5). Esse resultado sugere que pode haver variação no número de cópias entre genes de uma mesma família. Dentre as outras famílias de fatores de transcrição, BBM e VP1 também apresentaram variação no número de cópias, enquanto que AGL e LEC, por possuírem apenas um gene homólogo putativo, apresentaram 3 e 9 cópias gênicas, respectivamente (Tabela suplementar 1).

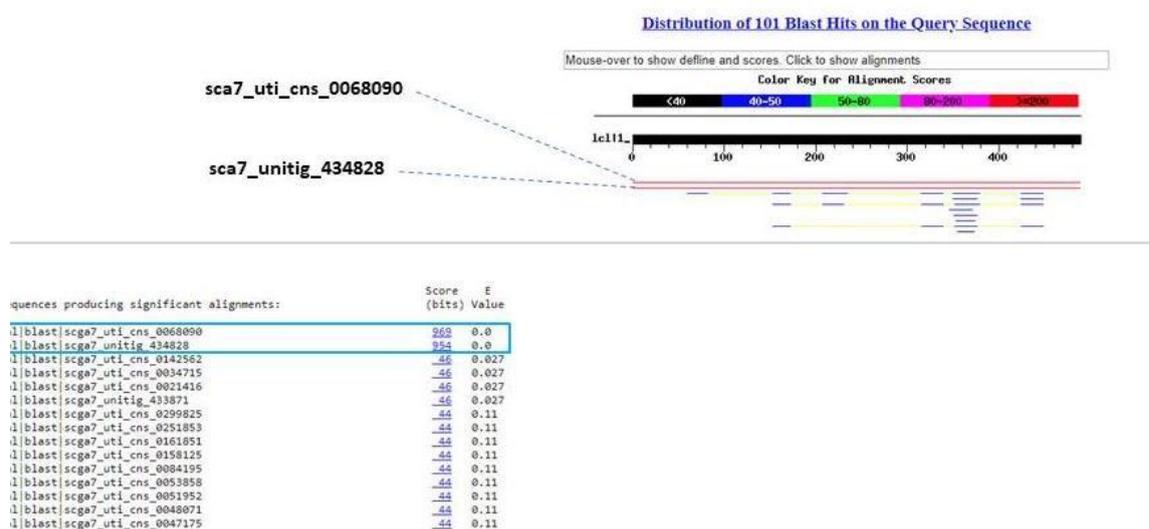


Figura 5: Resultado de pesquisa BLAST na plataforma do SUCEST-FUN referente à sequência SP803280WUS1. A seta indica o resultado alinhamento ($score \geq 200$) e o retângulo indica as mesmas sequências com e -value zero.

5.3 Filogenia

Em geral, as árvores filogenéticas apresentaram uma tendência na divisão dos grupos e ramos das árvores. Na maioria das proteínas estudadas, as árvores filogenéticas apresentaram a tendência de reunir as sequências de aminoácidos da cana-de-açúcar cultivada (SP80-3280) com a espécie selvagem (*S. spontaneum*) em um mesmo ramo ou próximos entre si. Também foi observado que as sequências de aminoácidos de sorgo e milho, de modo geral, permaneceram mais próximas das sequências de aminoácidos de cana-de-açúcar quando comparadas com as sequências de *A. thaliana* e outras espécies de Poaceae. A proximidade dos agrupamentos entre sequências de cana-de-açúcar com sorgo pode ocorrer em consequência da extensa colinearidade entre os genomas de ambas as

espécies, o que torna sorgo um modelo para estudos com cana-de-açúcar, assim como observado por Aitken et al (2014) e Gasmour et al (2018). Os agrupamentos entre sorgo e milho nas construções filogenéticas obtidas podem ser explicados devido à proximidade evolutiva entre ambas espécies (WHITKUS et al, 1992; DRAYE et al, 2001; JIAO et al, 2017). A proximidade entre as sequências da variedade cultivada SP80-3280 e da espécie *S. spontaneum* é explicada devido ao fato de os híbridos modernos serem oriundos do cruzamento entre *S. spontaneum* e *S. officinarum* (D-HONT et al, 1994; CHEAVEGATTI- GIANOTTO et al, 2011; PARK; DA SILVA, 2016), sendo que 12,25% da sequência genômica de SP80-3280 pode ser oriunda de *S. spontaneum* (ZHANG et al, 2018).

Nas árvores filogenéticas foi observada uma divisão entre as espécies representantes de metabolismo C3 e C4. Um dos exemplos é o agrupamento entre cana- de-açúcar, sorgo e milho, sendo todas C4. Em contrapartida as demais espécies de gramíneas presentes nas árvores filogenéticas são majoritariamente de metabolismo C3. Uma exceção foi observada nas proteínas de FT responsáveis pela ESI das espécies *Panicum hallii* (PhWOX9, PhWOX8, PhLEC1, PhVP1.1, PhVP1.2 e PhBBM2) e *Setaria italica* (SiWOX9, SiWOX8, SiLECB2, SiVP1 e SiBBM2). Ambas as espécies com metabolismo C4, apresentaram proximidade com *Dichantelium oligosanthos* (DoWOX9, DoWOX8, DoLECB6, DoVP1 e DoPLT2), que é de metabolismo C3. Isso pode ser explicado em razão de *Dichantelium* já ter sido considerado um sub-gênero de *Panicum*, devido a sua similaridade morfológica e número de cromossomos (CLAYTON; RENVOIZE, 1986; DUBCOVSKY; ZULOAGA, 1991; ALISCIONI et al, 2003), o que torna essa espécie um excelente modelo para comparações entre gramíneas C3 e C4 (STUDER et al, 2016).

Na análise de filogenia de proteínas WUS, foram encontrados 6 grupos principais: 1) de SbWUS2 a ZmWOX9; 2) ZmWOX2 a SspontWUS1; 3) SP803280WUS7 a ZmWOX3A; 4) ZmWUS2 a SspontWUS5; 5) ZmWOX4 a SspontWUS6 e; 6) SP803280WUS3 a SspontWUS3. As sequências SspontWUS4 e SP803280WUS4 (94,96% de identidade) apareceram próximas entre si, apesar de um valor de *bootstrap* mais moderado (65). Além disso, SbWUS 4 e ZmWOX8 aparecem isoladamente ao lado do ramo que gerou as sequências de cana-de-açúcar. (Figura 6).

A proteína putativa SP803280WUS2 se agrupou com SbWUS2 (98,59% de identidade), porém permaneceu em um ramo separado em relação ao seu homólogo de *S. spontaneum* (SspontWUS2) (97,14% de identidade), sugerindo, que para essas sequências, há uma maior similaridade entre um híbrido de cana com sorgo do que com uma espécie selvagem. Em contrapartida, SspontWUS3 se agrupou com SbWUS3, com similaridade entre as sequências de 87%. Nesse grupo, SP803280WUS3 foi disposta mais distante das demais sequências de aa e apresentou identidade inferior a 45% com as proteínas do mesmo grupo (Tabela suplementar 4). Isso indica que essa proteína putativa de uma espécie *Saccharum* possui maior similaridade e proximidade com sorgo. Além disso, observa-se que a sequência de aminoácidos de SP80-3280, apesar de ser disposta no mesmo grupo que as demais sequências (SspontWUS3 e SbWUS3), permaneceu mais distante, além de apresentar uma maior proximidade com uma proteína de milho (ZmWOX7).

Segundo a anotação funcional encontrada no Phytozome (GOODSTEIN et al, 2012), o gene WUS em *A. thaliana* desempenha um papel central na embriogênese precoce, em especial, na regulação de outros genes que controlam a ESI (AGL e LEC), na manutenção da identidade das células no meristema apical e participa da transição de células vegetativas para embriogênicas. Em *A. thaliana* também foi encontrado o gene AtWOX2, que é um FT responsável pela padronização dos embriões, especialmente no desenvolvimento de embriões apicais (HAECKER et al, 2004). Isso sugere que em uma mesma família gênica podem existir variados genes que desempenham funções diferentes, porém complementares nas vias de regulação da embriogênese.

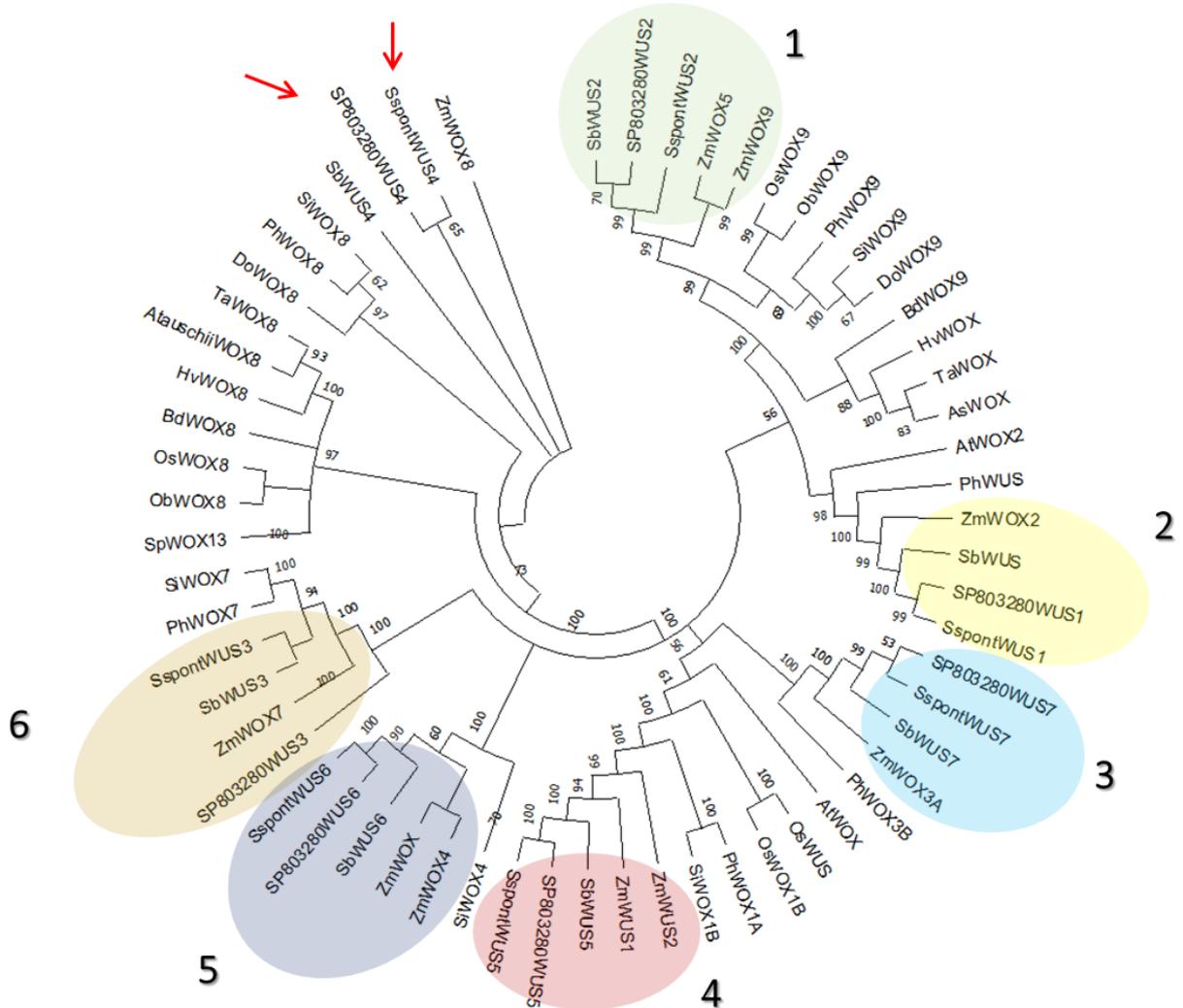


Figura 6: Árvore filogenética de proteínas de WUSCHEL em cana-de-açúcar, *Arabidopsis thaliana* e espécies de Poaceae. At: *Arabidopsis thaliana*; Sb: *Sorghum bicolor*; SP803280: SP80-3280; Sspont: *Saccharum spontaneum*; Zm: *Zea mays*; Ph: *Panicum hallii*; Si: *Setaria itálica*; Os: *Oryza sativa*; Ob: *Oryza brachyanta*; Do: *Dichanthelium oligosanthos*; Ta: *Triticum aestivum*; As: *Aegilops speltoides*; Hv: *Hordeum vulgare*; Bd: *Brachypodium distachyon*; Sp: *Stipa purpurea*; Atauschii: *Aegilops tauschii*.

A análise filogenética de proteínas VP1 apontou a formação de 3 grupos principais: 1) SP803280VP1.1 a SspontVP1.2; 2) SP803280VP1.10 a SspontVP1.4 e; 3) ZmVP1.2 a ZmVP1.4. No grupo 1, SP803280VP1.1 agrupou-se com a SspontVP1.1 (98,81% de identidade) e apresentaram proximidade com SbVP1.1 com cerca de 91,5% de identidade entre as proteínas (Tabela suplementar 5). Entretanto a sequência SspontVP1.2 permaneceu mais distante das demais, tendo maior proximidade com milho do que com as demais de cana-de-açúcar, mesmo que a porcentagem de identidade com a proteína milho (74,64%) tenha sido menor do que com as outras proteínas do grupo (SbVP1.1: 78,25%;

SP803280VP1.1: 83,87% e SspontVP1.1: 85%). No grupo 2, as proteínas de *S. spontaneum* (SspontVP1.4 e SspontVP1.3) foram dispostas em ramos originados a partir de um mesmo nó (98,92% de identidade). As sequências de aa SP803280VP1.10 e SP803280VP1.4 apresentaram proximidade entre si e com sorgo (68,94 e 72,73% de identidade, respectivamente), o qual foi disposto entre os dois genótipos de cana-de-açúcar (SP80-3280 e *S. spontaneum*). O grupo 3 não apresentou representantes da variedade comercial SP80-3280, em contrapartida, observou-se a presença de 4 proteínas de milho que se agruparam aos pares (ZmRAV1 com ZmVP1.2 e ZmVP1.3 com ZmVP1.4) . O único representante de cana-de-açúcar nesse grupo é SspontVP1.5, o qual é originado a partir de um nó em comum com SbVP1.3 (Figura 7).

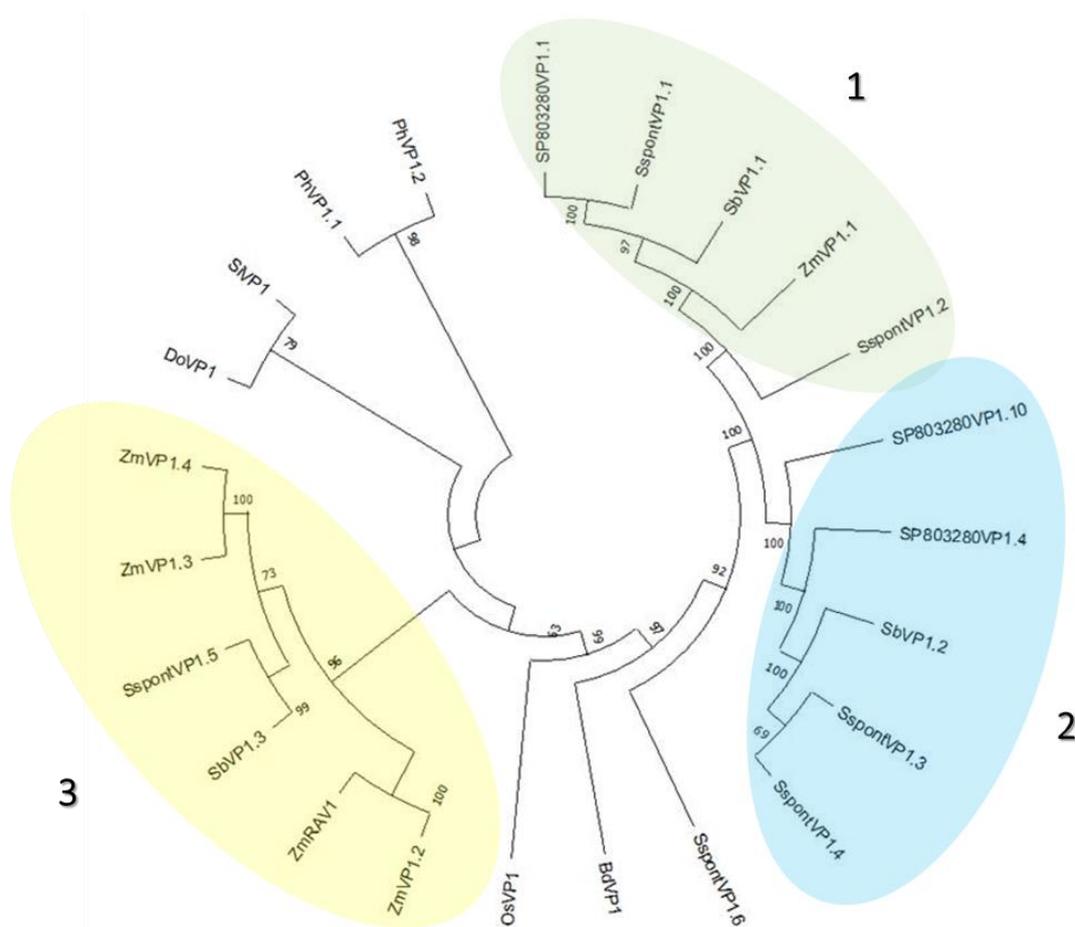


Figura 7: Árvore filogenética de proteínas de VIVIPAROUS1 em espécies de Poaceae. Sb: *Sorghum bicolor*; SP803280: SP80-3280; Sspont: *Saccharum spontaneum*; Zm: *Zea mays*; Ph: *Panicum hallii*; Si: *Setaria itálica*; Os: *Oryza sativa*; Do: *Dichanthelium oligosanthes*; Bd: *Brachypodium distachyon*.

A construção filogenética de AGL pode ser dividida em 3 grupos (*bootstrap* 100): 1) composto pelas sequências de SP80-3280, *S. spontaneum* e *S. bicolor*, 2)

sequências de *Z. mays* e; 3) *P. hallii* e *S. italica*. As proteínas de cana-de-açúcar são oriundas de um mesmo nó, portanto indicando serem as mais próximas evolutivamente, além disso, sugere-se proximidade com SbAGL1 (Figura 8). O alinhamento múltiplo indicou identidade de 98,79% entre SP803280AGL1 e SspontAGL1 e cerca de 83% com SbAGL1 (Tabela suplementar 6).

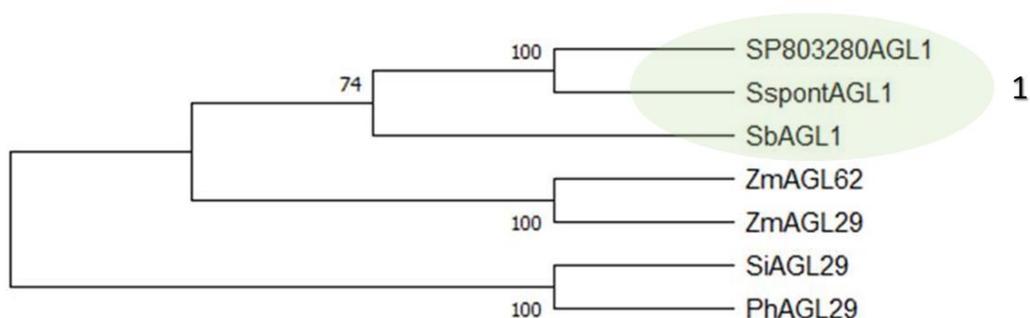


Figura 8: Árvore filogenética de proteínas de AGAMOUS-LIKE em espécies de Poaceae. **Sb:** *Sorghum bicolor*; **SP803280:** SP80-3280; **Sspont:** *Saccharum spontaneum*; **Zm:** *Zea mays*; **Ph:** *Panicum hallii*; **Si:** *Setaria italica*.

Em relação a LEC (Figura 9), ocorre a formação de 3 grupos: 1) SP80-3280LEC1 a ZmLECB2; 2) BnLECB6 a AtauschiiLECB3 e; 3) as proteínas SiLECB2, PhLEC1 e DoLECB6, as quais aparecem isoladas do restante dos ramos da árvore filogenética. As sequências de cana SP803280LEC1 e SspontLEC1 apresentam proximidade entre si (97,74% de identidade) sendo oriundas de um mesmo nó (*bootstrap* 94). Adicionalmente, observa-se proximidade com uma sequência de aa de sorgo (SbLE1), que aparece disposta ao lado das ramificações de cana-de-açúcar. A proteína de sorgo (SbLEC1) apresentou aproximadamente 91% de similaridade com as sequências de aa de cana-de-açúcar (Tabela suplementar 6). Tanto para LEC quanto para AGL, observa-se que existe uma alta proximidade entre uma espécie selvagem de cana-de-açúcar (*S. spontaneum*) e uma variedade (SP80-3280).

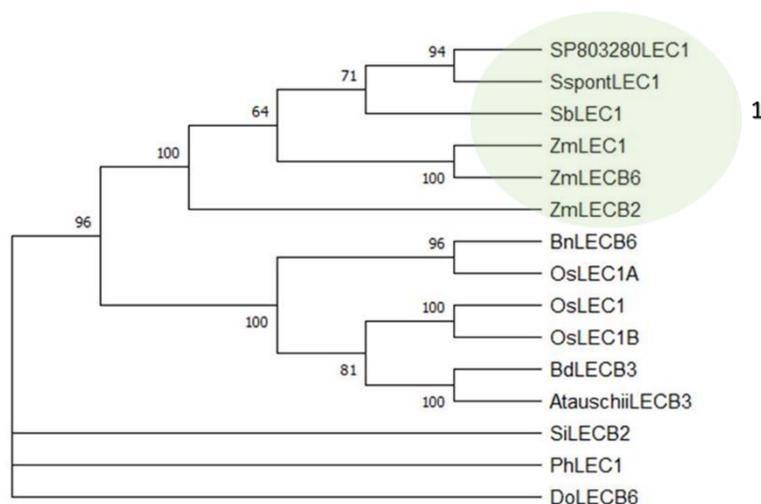


Figura 9: Árvore filogenética de proteínas de LEAFY-COTYLEDON em espécies de Poaceae. **Sb:** *Sorghum bicolor*; **SP803280:** SP80-3280; **Sspont:** *Saccharum spontaneum*; **Zm:** *Zea mays*; **Ph:** *Panicum hallii*; **Si:** *Setaria itálica*; **Os:** *Oryza sativa*; **Do:** *Dichanthelium oligosanthes*; **Bd:** *Brachypodium distachyon*; **Atauschii:** *Aegilops tauschii*; **Bn:** *Brassica napus*.

Maulidiya et al (2020) encontraram a primeira possível sequência de LEC (390 pb) em calos embriogênicos de cana-de-açúcar (variedade Bululawang). O estudo realizou o alinhamento da sequência de aminoácidos de cana com outras espécies de gramíneas para a construção de uma árvore filogenética. As análises indicaram similaridade com *Dactylis glomerata* (98%), *O. sativa* (90%), *Z. mays* (88%) e *Bixa orellana* (85%).

A construção filogenética de sequências de aa de BBM (Figura 7) pode ser dividida em 3 grupos principais: 1) SP803280BBM4 a SP803280BBM5; 2) SP803280BBM7 a SspontBBM5 e; 3) ZmGDB a SspontBBM2. No grupo 1, a sequência SP803280WUS4 possui maior proximidade com SspontBBM3, sendo originadas a partir de um mesmo nó da representação filogenética e com 98,71% de similaridade entre as sequências. Adicionalmente, ambas sequências apresentarem proximidade com SbBBM. Todavia, no mesmo grupo, a sequência SP803280BBM5 aparece mais distante das demais proteínas de cana-de-açúcar e sorgo, além de possuir maior proximidade com uma sequência de aa de milho (ZmBBM2) (Figura 10). Todas as sequências de aa desse grupo apresentaram entre si porcentagens de identidade acima de 92% (Tabela suplementar 7).

No grupo 2, as sequências de *S. spontaneum* (SspontBBM4 e SspontBBM5) possuem maior proximidade entre si (93,82% de identidade), sendo oriundas de um nó em comum, enquanto que SP803280BBM7 se agrupou com ZmBBM2a (43,73%). A proteína SbBBMx apresentou maior similaridade com as sequências

de *S. spontaneum* (Tabela suplementar 7). Por fim, o grupo 3 também teve duas proteínas de *S. spontaneum* (SspontBBM1 e SspontBBM2) sendo originadas a partir de um nó em comum. Ao lado das sequências da espécie selvagem de cana-de-açúcar se dispôs SP803280BBM2, fortalecendo a tendência de proteínas de um híbrido moderno de cana-de-açúcar apresentar proximidade filogenética com proteínas de *S. spontaneum* (Figura 10).

Maulidiya et al (2020) foram responsáveis pelos primeiros relatos de um possível gene da família BBM em cana-de-açúcar. Os autores identificaram uma sequência BBM com 494 pb após construir pares de *primers*, baseados em regiões conservadas do genoma de milho e *D. Glomerata*. Esses *primers* foram utilizados em análises de expressão gênica de CE e CNE da variedade de cana-de-açúcar Bululawang. O estudo demonstrou que a expressão do gene BBM foi detectada em todos os estágios de desenvolvimento dos CE, tendo seu ápice no estágio globular. Além disso, o estudo indicou que CNE apresentaram expressão baixa ou nula, o que indica uma forte tendência dessa possível sequência de BBM estar relacionada com o desenvolvimento de calos embriogênicos somáticos de cana-de-açúcar. Na análise filogenética da proteína do gene BBM, os resultados indicaram alta similaridade com *S. bicolor* (98%), *Z. mays* (96%), *S. italica* (95%) e *P. hallii* (94%). Esses achados corroboram com os resultados encontrados no presente trabalho, em que podemos observar a proximidade evolutiva entre as 4 proteínas putativas de cana-de-açúcar com sorgo e milho, apesar dos acessos de *S. italica* e *P. hallii* permanecerem em um ramo separado das demais sequências de aminoácidos.

amplificar regiões genômicas da variedade comercial SP80-3280, demonstrou que apenas os pares nomeados de BBM2a e BBM7a (Figura suplementar 6) não produziram fragmentos na amplificação via PCR convencional. Assim, tais *primers* foram considerados inviáveis de serem utilizados na identificação de sequências putativas de BABYBOOM em cana-de-açúcar. Por outro lado, 10 *primers* (WUS2a, WUS2b, WUS3b, WUS5a, WUS6b, LEC1a, VP1a, VP1.4a, VP1.10a e BBM4a) foram capazes de promover a amplificação de fragmentos únicos (Figuras suplementares 2, 3, 5 e 6), sendo considerados os *primers* com maior especificidade dentre todos os testados. Os *primers* LEC1a e VP1.4a, apesar de anelarem em fragmentos específicos do DNA da cana-de-açúcar, ambos apresentaram altos valores para formação de dímeros e *hairpins* na análise do *software* Beacon Designer. Doze pares de *primers* (WUS1b, WUS3a, WUS4a, WUS4b, WUS5c, WUS6a, WUS7a, WUS7b, WUS7c, AGL1a, LEC1b e VP1b) produziram 2 fragmentos, enquanto que os demais (WUS1a, WUS2d, WUS5b, BBM2b, BBM2c, BBM2d, BBM4b, BBM5a, BBM5c, BBM7b e BBM7c) apresentaram três ou mais fragmentos amplificados (Figuras complementares 2, 3, 4, 5 e 6). Em relação aos gradientes de temperatura utilizados para encontrar a melhor temperatura de *melting* de cada par de *primers*, os resultados apontaram que não houve diferença dentro das faixas de temperatura testadas (53-55-57°C e 61-62-63°C).

Segundo McPherson e Moller (2006), a especificidade de um *primer* é uma característica de suma importância, pois garante que apenas as sequências alvo de estudo sejam aneladas e, conseqüentemente, amplificadas via PCR. Outro fator levado em consideração na escolha de *primers* para estudos de PCR é a capacidade de formação de dímeros e *hairpins*, dado que essas estruturas são prejudiciais à amplificação de ácidos nucleicos, afetando a velocidade e sensibilidade dessas técnicas (MEAGHER et al, 2018). Desse modo, o presente estudo originou 8 pares de *primers* (WUS2a, WUS2b, WUS3b, WUS5a, WUS6b, VP1a, VP1.10a e BBM4a) que possuem alta especificidade de anelamento no DNA da cana-de-açúcar e com baixos valores de formação de dímeros e *hairpins*. Esses *primers* são ideais para serem usados em estudos futuros de expressão gênica de genes relacionados com ES em cana-de-açúcar, especialmente em estudos comparativos entre diferentes estágios dos calos ao longo do tempo ou, até mesmo, entre variedades responsivas *in vitro* e recalcitrantes.

Tabela 2: Pares de primers desenvolvidos para regiões exônicas presentes em genes das famílias AGL, LEC, WUS, VP1 e BBM, usando o software PRIMER3.

Gene	Gene	Foward primer	Reverse primer	Nomenclatura própria
AGL	SP803280AGL1	AGCGCCGCCCAAGCTTATTC	TCGAAAGTGTGCGCGGCAAG	AGL1a*
LEC	SP803280LEC1	AACAACGGCGTCGCTCAGCAG	ATCACGTTTCGCGATTGGCATCAG	LEC1a*
		AACAACGGCGTCGCTCAGCAG	ACGTTTCGCGATTGGCATCAGC	LEC1b
WUS	SP803280WUS1	AATGCATTCTACATGCCTGCGCC	ATGACTGTCACTTGCTGCTGCG	WUS1a*
		AATGCATTCTACATGCCTGCGCC	ATGACTGTCACTTGCTGCTGCGG	WUS1b
	SP803280WUS2	TCGGCAAGGTGGAGAGCAAGAAC	TTCTTGTGGTGGTGGCGCTCG	WUS2a
		AGCGCCACCACCACAAGAAGC	TCGTTGCTACCACTGCCGCTG	WUS2b
		AGCGCCACCACCACAAGAAGC	TTCTCTGTTGCTACCACTGCCG	WUS2c
		AGACGCTGGAGCTCTTC	AAGGAGAACTCCCTGCAC	WUS2d
	SP803280WUS3	AGCAAGGCGGACAGCATTACCTG	AGCTTCGTTGCACAGGCCAAAG	WUS3a
		ACACCCACACGACGCATGAGC	TTCTGTTGCACAGGCCAAAGAGC	WUS3b
	SP803280WUS4	ATGGCAACCAACACCAATGCAGC	AGATTTGGCCATGGTGCAGAGC	WUS4a*
		ACGATGGCAACCAACCAATGC	AGATTTGGCCATGGTGCAGAGC	WUS4b*
	SP803280WUS5	ACGGCAAGATCGAGGGCAAGAAC	ACGTTGACGTCGAGGTTGGTGAG	WUS5a
		ACGGCAAGATCGAGGGCAAGAAC	ATGAAGGCGACGACAGCGAGG	WUS5b
		ACTGTCAGTGCCACTTCCGTTGG	ATGCTGCTGCTGATGCATCTTGG	WUS5c*
	SP803280WUS6	AATATTGTCTGCGCCCGCTTGC	TGACGCGAGCAAACCTCAGGAAGG	WUS6a
		TTCCAGAACCACAAGGCCCGC	AGCAGCGTGAAGAAGTGGTGTC	WUS6b
SP803280WUS7	TACAGCAGCGACGGCTTCGAG	TGTGGCACGAAGTTGGTTGCG	WUS7a	
	AGCACTGCAACGCCAGCTACG	TGCTGCACTCGTCTTGAGCC	WUS7b	
	GCAGCAGCAGGAGGAAATAAGGC	ACCGTAGCTGGCGTTGCAGTG	WUS7c	
VP1	SP803280VP1	AGCGCCTACACCAACAGCAGCAG	ATGTCATCGAGCGCATCAAACCC	VP1a
		AGGCGGCGGATGACTTCATGTTTC	TGTCGTGTTGGTGTAGGCGCTG	VP1b
	SP803280VP1.4	TGTTTGGCGTCAACATCGCTGG	TTCTTCAACAATTCCTGCGGCC	VP1.4a*
SP803280VP1.10	ACGCCAAAGAAGCAAGACGAAGG	TGTC AACGCCGAACAGCTTGATG	VP1.10a	
BBM	SP803280BBM2	ACAACCTGGCTGGGATTCTCG	TGCCATAGGAAGCGTGATCG	BBM2a
		AGCACCAACAGCAACAGC	AATCCGAGCAGCCAAAGC	BBM2b
		TCCTGATGCCGTCGAACAC	TCGTACCCGATGAGCTTCC	BBM2c
		ACCAGGAGGGGAAGCTCATC	ATGCCGTTGAAAGGAGAGC	BBM2d
	SP803280BBM4	GCCCAAGCTCGAAGATTTCC	TTGCTGTTGGTGGTGGCTGCTG	BBM4a
		AGCTCGGCAGTCTACAACAG	TGTTTCGACGGCATCAGGAAG	BBM4b
	SP803280BBM5	ATGCCACTTCTCGCTGGAC	TTCTTGGCGTGGTGGTGGCTG	BBM5a
		TGATAGCAACGGCAGCAC	TAGTTCTCCGCTTCCACCAG	BBM5b
	SP803280BBM7	GGGGGCACATCATCATCATC	TCCTCTTGACGGTGATGCTG	BBM7a
		ACGCCTACGAGTACCACAAC	TGTTGCCAAACCCATTCCAG	BBM7b
ATACGACATCGCGCGATAG	TGGGTTTCAGCCATGTGATG	BBM7c*		

*Par de primers que possui alta formação de dímeros e hairpin

6 CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu a identificação de 16 e 20 sequências putativas de aminoácidos de famílias de genes relacionados à ESI na cana-de-açúcar comercial SP80-3280 e *S.spontaneum*, respectivamente. As análises indicaram que podem existir mais de um gene para as famílias gênicas WUS, VP1 e BBM envolvidos na regulação das vias da ESI em cana-de-açúcar. As construções filogenéticas sugerem que as proteínas e genes putativos de SP80-3280 são conservados ao longo da evolução, dada a consistência de agrupamento dessas sequências com proteínas homólogas de *S. spontaneum*, sorgo e milho. A identificação das sequências proteicas e genômicas com possível ligação com a ESI no genoma da cana poderá servir de base em estudos de expressão gênica, que permitirão compreender o comportamento e a importância desses genes na regulação dessa via no desenvolvimento *in vitro* de cana-de-açúcar.

7 LITERATURA CITADA

AITKEN, K. S. et al. A comprehensive genetic map of sugarcane that provides enhanced map coverage and integrates high-throughput Diversity Array Technology (DArT) markers. **BMC Genomics**, v. 15, p. 152, 2014.

ALCANTARA, G. B. et al. Plant regeneration and histological study of the somatic embryogenesis of sugarcane (*Saccharum* spp.) cultivars RB855156 and RB72454. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 36, n. 1, p. 63-72, 2014.

ALISCIONI, S. S.; GIUSSANI, L. M.; ZULOAGA, F. O.; KELLOGG, E. A. A molecular phylogeny of *Panicum* (Poaceae: Paniceae): Tests of monophyly and phylogenetic placement within the Panicoideae. **American Journal of Botany**, v. 90, n. 5, p. 796-821, 2003.

ALTPETER, F. et al. Advancing crop transformation in the era of genome editing. **The Plant Cell**, v. 28, n. 7, p. 1510-1520, 2016.

ARRUDA, P. Genetically modified sugarcane for bioenergy generation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 315-322, 2012.

BOUCHABKÉ-COUSSA, O. et al. Wuschel overexpression promotes somatic embryogenesis and induces organogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) tissues cultured in vitro. **Plant Cell Reports**, v. 32, n. 5, p. 675–686, 2013.

BOUTILIER, K. et al. Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. **Plant Cell**, v.14, p.1737–1749, 2002.

BRAYBROOK, S. A.; HARADA, J. J. LECs go crazy in embryo development. **Trends in Plant Science**, v.13, p.624–630, 2008.

BUTTERFIELD, M. K.; THOMAS, D. W. Sucrose, yield and disease resistance characteristics of sugarcane varieties under test in the SASEX selection programme. In: **Proc S Afr Sug Technol Ass**. 1996. p. 103-105.

CARNEIRO, M. S.; MACHADO JUNIOR, G. R.; HOFFMANN, H. P. Sugarcane – Basic information on the plant. In: LAM, E.; CARRER, H. SILVA, J. A.; KOLE, C. **Compendium of Bioenergy Plants**. Boca Raton: CRC Press, 2016. Cap. 1, p. 1-13.

CARVALHO, J. M. F. C.; LIMA, M. M. A.; AIRES, P. S. R.; VIDAL, M. S.; PIMENTEL, N. W. **Embriogênese somática**. Campina Grande: EMBRAPA, p.24, 2006.

CHEAVEGATTI GIANOTTO, A. et al. Sugarcane (*Saccharum officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, Kunia, USA, v.4, p. 62-89, 2011.

CHENGALRAYAN, K.; GALLO-MEAGHER, M. Effect of various growth regulators on shoot regeneration of sugarcane. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 37, n. 4, p. 434-439, 2001.

CHEONG, E. J.; MOCK, R.; LI, R. Elimination of five viruses from sugarcane using in vitro culture of axillary buds and apical meristems. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 109, n. 3, p. 439-445, 2012.

CLAYTON, W. D. et al. Genera graminum. Grasses of the world. **Genera graminum. Grasses of the World**, v. 13, 1986.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira cana-de-açúcar safra 2020/21**. Brasília, v.7, n.2, p. 1-54, 2020.

CORRER, F. H. et al. Differential expression in leaves of *Saccharum* genotypes contrasting in biomass production provides evidence of genes involved in carbon partitioning. **BMC genomics**, v. 21, n. 1, p. 1-16, 2020.

DAL-BIANCO, M. et al. Sugarcane improvement: how far can we go? **Current opinion in biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 265-270, 2012.

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

DE-LA-PEÑA, C. et al. The role of chromatin modifications in somatic embryogenesis in plants. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 635, 2015.

DE MELLO, U. S. et al. An overview of the transcriptional responses of two tolerant and susceptible sugarcane cultivars to borer (*Diatraea saccharalis*) infestation. **Functional & Integrative Genomics**, p. 1-17, 2020.

DESAI, N. S. et al. Study of elemental variations during somatic embryogenesis in sugarcane using photon induced X-ray probe. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, v. 252, n. 2, p. 299- 302, 2006.

D'HONT, A. et al. A molecular approach to unraveling the genetics of sugarcane, a complex polyploid of the Andropogoneae tribe. **Genome**, v. 37, n. 2, p. 222-230, 1994.

DRAYE, X. et al. Toward integration of comparative genetic, physical, diversity, and cytomolecular maps for grasses and grains, using the sorghum genome as a foundation. **Plant Physiology**, v. 125, n. 3, p. 1325-1341, 2001.

DUBCOVSKY, J.; ZULOAGA, F. O. Números cromosómicos de especies sudamericanas de *Panicum* (Poaceae). **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, v. 27, p. 201–206, 1991.

FERREIRA, L. T. et al. Using LED lighting in somatic embryogenesis and micropropagation of an elite sugarcane variety and its effect on redox metabolism during acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 128, n. 1, p. 211-221, 2017.

FLOREZ, S. L.; ERWIN, R. L.; MAXIMOVA, S. N.; GUILTINAN, M. J.; CURTIS, W. R. Enhanced somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* using the homologous BABY BOOM transcription factor. **BMC Plant Biology**, v. 15, 2015.

GANDONOU, C. H. et al. Effect of genotype on callus induction and plant regeneration from leaf explants of sugarcane (*Saccharum* sp.). **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 11, 2005.

GARSMEUR, O. et al. A mosaic monoploid reference sequence for the highly complex genome of sugarcane. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 2638, 2018.

GILL, N. K.; GILL, R., GOSAL, S. S. Factor enhancing embryogenesis and plant regeneration in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Indian Journal of Biotechnology**, v.3, p. 119-123, 2004.

GOODSTEIN, D. M. et al. Phytozome: A comparative platform for green plant genomics. **Nucleic Acids Res.** 40. D1178–D1186, v. 337, 2012.

GRUSZCZYŃSKA, A.; RAKOCZY-TROJANOWSKA, M. Expression analysis of somatic embryogenesis-related SERK, LEC1, VP1 and NiR orthologues in rye (*Secale cereale* L.). **Journal of applied genetics**, v. 52, n. 1, p. 1-8, 2011.

GUIDERDONI, E.; DEMARLY, Y. Histology of somatic embryogenesis in cultured leaf segments of sugarcane plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.14, p.71-88, 1988.

HAECKER, A. et al. Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. **Development**, v. 131, n. 3, p. 657-668, 2004.

HENRY, R. J.; KOLE, C. (Ed.). **Genetics, genomics and breeding of sugarcane**. CRC Press, 2010.

HERINGER, A. S.; REIS, R. S.; PASSAMANI, L. Z.; SOUZA-FILHO, G. A.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V. Comparative proteomics analysis of the effect of combined red and blue lights on sugarcane somatic embryogenesis. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, n. 52, 2017.

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

HORSTMAN, A.; WILLEMSSEN, V.; BOUTILIER, K.; HEIDSTRA, R. AINTEGUMENTA-LIKE proteins: hubs in a plethora of network. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 3, p.146-157, 2014.

HOTTA, C. T. et al. The biotechnology roadmap for sugarcane improvement. **Tropical Plant Biology**, v. 3, n. 2, p. 75-87, 2010.

JAHANGIR, G. Z.; NASIR, I. A.; IQBAL, M. Disease free and rapid mass production of sugarcane cultivars. **Adv. life sci**, v. 1, n. 3, p. 171-180, 2014.

JIAO, Y. et al. Improved maize reference genome with single-molecule technologies. **Nature**, v. 546, n. 7659, p. 524-527, 2017.

JIMENEZ, V. M.; BANGERTH, F. Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and non-embryogenic cultures of carrot. **Physiology Plant**, v. 111, p. 389–395, 2001.

JOSHI, S.; JAIN, M.; TILLMAN, B. L.; ALTPETER, F.; GALLO, M. Comparative analysis of direct plant regeneration from immature leaf whorl and floral explants for three elite US sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) genotypes. **In vitro Cell. Dev. Biol. – Plant**, v. 49, p. 674-681, 2013.

LAKSHMANAN, P. et al. Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 41, n. 4, p. 345-363, 2005.

LAKSHMANAN, P. et al. Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids) leaf culture. **Plant cell reports**, v. 25, n. 10, p. 1007-1015, 2006.

LIU, M. C. Factors affecting induction, somatic embryogenesis and plant regeneration of callus from cultured immature inflorescences of sugarcane. **Journal of Plant Physiology**, v. 141, n. 6, p. 714-720, 1993.

LOWE, K. et al. Morphogenic Regulators *BABY BOOM* and *Wuschel* Improve Monocot Transformation. **The Plant Cell**, v.28, p.1998-2015, 2016.

MAHMUD, I.; SHRESTHA, B.; BOROUJERDI, A.; CHOWDHURY. NMR-based metabolomics profile comparisons to distinguish between embryogenic and non-embryogenic callus tissue of sugarcane at the biochemical level. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant**, v. 51, p.340-349, 2015.

MARSCH-MARTINEZ, N.; GRECO, R.; BECKER, J. D.; DIXIT, S.; BERGERVOET, J. H. W.; KARABA, A.; FOLTER, S.; PEREIRA, A. *BOLITA*, an Arabidopsis AP2/ERF-like transcription factor that affects cell expansion and proliferation; differentiation pathways. **Plant Molecular Biology**, v.62, p.825-843, 2006.

MAULIDIYA, A. U. K. et al. Expression of somatic embryogenesis-related genes in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 207-214, 2020.

MCPHERSON, M.; MOLLER, S. **Optimization of PCR**. New York: T&F inform, p. 65-85, 2006.

MEAGHER, R. J. et al. Impact of primer dimers and self-amplifying hairpins on reverse transcription loop-mediated isothermal amplification detection of viral RNA. **Analyst**, v. 143, n. 8, p. 1924-1933, 2018.

MING, R. et al. Sugarcane improvement through breeding and biotechnology. **Plant breeding reviews**, v. 27, p. 15, 2006.

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

MUSTAFA, G.; JOYIA, F. A.; ANWAR, S.; PARVAIZ, A.; KHAN, M. S. Biotechnological Interventions for the improvement of sugarcane crop and sugar production. In: OLIVEIRA, A. **Sugarcane – Technology and Research**. IntechOpen, 2018. Cap. 7, p. 113-138.

NAMASIVAYAM, P. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 90, p.1–8, 2007.

NERKAR, G. et al. Genetic Transformation of Sugarcane and Field Performance of Transgenic Sugarcane. In: **Biotechnologies of Crop Improvement, Volume 2**. Springer, Cham, 2018. p. 207-226.

NEVES, N. et al. Biochemical characterization of embryogenic and non-embryogenic calluses of sugarcane. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 39, n. 3, p. 343-345, 2003.

PARK, J. W.; SILVA, J. A. Hybridization of sugarcane and other grasses for novel traits. In: LAM, E.; CARRER, H. SILVA, J. A.; KOLE, C. **Compendium of bioenergy plants**. BocaRaton: CRC Press, 2016. Cap. 1, p. 15-30.

PASSARINHO, P.; KETELAAR, T.; XING, M.; VAN ARKEL, J.; MALIEPAARD, C.; JOOSEN, R.; LAMMERS, M.; HERDIES, L.; DEN BOER, B.; VAN DER GEEST, L.; BOUTILIER, K. BABY BOOM target genes provide diverse entry points into cell proliferation and cell growth pathways. **Plant Molecular Biology**, v. 68, p. 225-237, 2008.

PASTERNAK, T. P. et al. The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. **Plant Physiol**,

v. 129, p.1807–1819, 2002.

PATHAK, M.R. AND HAMZAH, R.Y. An Effective Method of Sonication-Assisted *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Chickpea. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 93, p. 65-71, 2008.

PIPERIDIS, N.; D'HONT, A. Sugarcane genome architecture decrypted with chromosome-specific oligo probes. **The Plant Journal**, v. 103, n. 6, p. 2039-2051, 2020.

PULIANMACKAL, A. J.; KAREEM, A. V. K.; DURGAPRASAD, K.; TRIVEDI, Z. B.; PRASAD, K. Competence and regulatory interactions during regeneration in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. 142, p. 1-16, 2014.

ROCHA, D. I.; DORNELAS, M. C. Molecular overview on plant somatic embryogenesis. **CAB Reviews Perspectives in Agriculture, Veterinary, Science, Nutrition and Natural Resources**, v.8, n.22, 2013.

ROTT, P. **Achieving sustainable cultivation of sugarcane Volume 2: Breeding, pests and diseases**. Burleigh Dodds Science Publishing, 2018. 468p.

SAAD, A. I. M.; ELSHAHED, A. M. **Plant tissue culture media**. Recent advances in plant in vitro culture, p. 30-40, 2012.

SCHAKER, P. D. C.; PALHARES, A. C.; TANIGUTI, L. M.; PETERS, L. P.; CRESTE, S.; AITKEN, K. S.; VAN SLUYS, M. A.; KITAJIMA, J. P.; VIEIRA, M. L. C.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B. RNAseq transcriptional profiling following whip development in sugarcane smut disease. **PLoS ONE**, v.11, n.9, 2016.

SCHMITTGEN, T. D; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v.3, p. 1101–1108, 2008.

SHAHZAD, A. et al. Historical perspective and basic principles of plant tissue culture. In: **Plant biotechnology: principles and applications**. Springer, Singapore, 2017. p. 1-36.

SHANKAR, M. et al. Development of a simple and genotype independent in vitro regeneration system in Sugarcane [*Saccharum* spp] using shoot apex explants. **Electronic Journal of Plant Breeding**, v. 9, n. 3, p. 1077-1082, 2018.

SHIMELIS, D.; BANTTE, K.; FEYISSA, T. Interaction Effects of 6-Benzylaminopurine and Kinetin on In vitro Shoot Multiplication of Two Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Genotypes. **Advances in Crop Science and Technology**, 2014.

SHIVANI; AWASTHI, P.; SHARMA, V.; KAUR, N.; KAUR, N.; PANDEY, P.; TIWARI, S. Genome-wide analysis of transcription factors during somatic embryogenesis in banana (*Musa* spp.) cv. Grand Naine. **PLoS One**, v.12, e182242, 2017.

SILVEIRA, V.; VITA, A. M.; MACEDO, A. F.; DIAS, M. F. R.; FLOH, E. I. S.; SANTA-CATARINA, C. Morphological and polyamine content changes in embryogenic and

non-embryogenic callus of sugarcane. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.114, e.3, p.351-364, 2013.

SNYMAN, S. J.; MEYER, G. M.; KOCHI, A. C.; BANASIAK, M.; WATT, M. P. Applications of in vitro culture systems for commercial sugarcane production and improvement. **In Vitro Cell Dev. Biol. Plant**, v. 47, p. 234-249, 2011.

SOUZA, G. M. et al. Assembly of the 373k gene space of the polyploid sugarcane genome reveals reservoirs of functional diversity in the world's leading biomass crop. **GigaScience**, v. 8, n. 12, p. giz129, 2019.

STUDER, A. J. et al. The draft genome of the C3 panicoid grass species *Dichanthelium oligosanthes*. **Genome biology**, v. 17, n. 1, p. 223, 2016.

SUZUKI, M.; KAO, C. Y.; MCCARTY, D. R. The conserved B3 domain of VIVIPAROUS1 has a cooperative DNA binding activity. **Plant Cell**, v.9, p.799–807, 1997.

TAPARIA, Y.; GALLO, M.; ALTPETER, F. Comparison of direct and indirect embryogenesis protocols, biolistic gene transfer and selection parameters for efficient genetic transformation of sugarcane. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 111, n.2, p. 131-141, 2012.

THAKARE, D.; TANG, W.; HILL, K.; PERRY, S. E. The MADS-domain transcriptional regulator AGAMOUS-LIKE15 promotes somatic embryo development in Arabidopsis and soybean. **Plant Physiology**, v.146, p.1663–1672, 2008.

THORPE, T. A. History of plant tissue culture. **Molecular biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 169-180, 2007.

UDDENBERG, D.; VALLADARES, S.; ABRAHAMSSON, M. SUNDSTROM, J.; SUNDAS-LARSSON, von ARNOLD, S. Embryogenic potential and expression of embryogenesis – related genes in conifers are affected by treatment with histone deacetylase inhibitor. **Planta**, v.234, p.527-539, 2011.

ULHOA, A. B. et al. Molecular characterization of inbred lines of yellow Jalapeño pepper. **Horticultura Brasileira**, v. 32, n. 1, p. 35-40, 2014.

WHITKUS, R.; DOEBLEY, J.; LEE, M.. Comparative genome mapping of Sorghum and maize. **Genetics**, v. 132, n. 4, p. 1119-1130, 1992.

YANG, X. Y.; ZHANG, X. L. Regulation of Somatic Embryogenesis in Higher Plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.29, p.36-57, 2010.

YASEEN, M. et al. Role of carbon sources for in vitro plant growth and development. **Molecular biology reports**, v. 40, n. 4, p. 2837-2849, 2013.

YIN, K.; GAO, C.; QIU, J. L. Progress and prospects in plant genome editing. **Nature Plants**, v. 3, n. 17107, 2017.

ZAVATTIERI, M. A et al. Induction of somatic embryogenesis as an example of stress- related plant reactions. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.13, p.1–9, 2010.

ZHAI, L.; XU, L.; WANG, Y.; ZHU, X.; FENG, H.; LI, C., LUO, X.; EVERLYNE, M. M.; LIU, L. Transcriptional identification and characterization of differentially expressed genes associated with embryogenesis in radish (*Raphanus sativus* L.). **Nature Scientific Reports**, v.6, n.21652, 2016.

ZHANG, J. et al. Allele-defined genome of the autopolyploid sugarcane *Saccharum spontaneum* L. **Nature genetics**, v. 50, n. 11, p. 1565-1573, 2018.

ZUO, J.; NIU, Q.; FRUGIS, G.; CHUA, N. The *WUSCHEL* gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v.30, p.349-359, 2002.

APÊNDICE

Tabela suplementar 1: Número de cópias gênicas obtidas em pesquisa BLAST na plataforma SUCEST-FUN relativas às sequências putativas de BBM, WUS, VP1, AGL e LEC.

Gene	Sequência	Número de cópias
BBM	SP803280BBM2	10
	SP803280BBM4	12
	SP803280BBM5	11
	SP803280BBM7	7
WUS	SP803280WUS1	2
	SP803280WUS2	3
	SP803280WUS3	8
	SP803280WUS4	13
	SP803280WUS5	5
	SP803280WUS6	2
	SP803280WUS7	5
VP1	SP803280VP1.1	6
	SP803280VP1.4	11
	SP803280VP1.10	8
AGL	SP803280AGL1	3
LEC	SP803280LEC1	9

Tabela suplementar 2: Lista de abreviaturas com seus significados correspondentes.

Abreviatura	Significado
2,4-D	Ácido-2,4-diclorofenoxiacético
AIL	AINTEGUMENTA-LIKE
AGL	AGAMOUS-LIKE
BAP	6-Benzilaminopurina
BBM	BABYBOOM
BOL	BOLITA
CDS	<i>Coding segment</i>
CE	Calos embriogênicos
CNE	Calos não embriogênicos
ES	Embriogênese somática
ESD	Embriogênese somática direta
ESI	Embriogênese somática indireta
FT	Fatores de transcrição
L1L	LEAFY COTYLEDON LIKE
LEC	LEAFY COTYLEDON
MS	Murashige e Skoog
T-DNA	DNA de transferência
UV	Ultra-violeta
VP1	VIVIPAROUS1
WUS	WUSCHEL

Tabela suplementar 3: Número de aminoácidos das proteínas e pares de base dos genes putativos relacionados à embriogênese somática na variedade comercial SP80-3280. A tabela também fornece as entradas que podem ser utilizadas para acessar as sequências de aminoácidos (aa) e genômica (nucleotídeos [nt]) no banco de dados do SUCEST-FUN, assim como a orientação da fita de nucleotídeos.

Gene	Número de aa	Nucleotídeos (pb)	Entrada no SUCEST-FUN (aa)	Entrada no SUCEST-FUN (nt)	Sentido da fita
AGL1	247	744	>gn blast evm.model.scga7_uti_cns_0030766.2 unnamed protein product	scga7_uti_cns_0030766:19476..20219	Senso
LEC1	266	801	>gn blast evm.model.scga7_uti_cns_0241187.1 unnamed protein product	scga7_uti_cns_0241187:2406..3206	Anti-senso
VP1	696	4142	>gn blast evm.model.scga7_uti_cns_0074780.1 unnamed protein product	scga7_uti_cns_0074780:7139..11280	Senso
VP1.4	362	1089	>gn blast evm.model.scga7_uti_cns_0182223.1 unnamed protein product	scga7_uti_cns_0182223:979..2067	Anti-senso
VP1.10	277	834	>gn blast evm.model.scga7_uti_cns_0023249.6 unnamed protein product	scga7_uti_cns_0023249:53823..54656	Senso
WUS1	162	489	>gn blast evm.model.scga7_uti_cns_0068090.1 unnamed protein product	scga7_uti_cns_0068090:1503..1991	Senso
WUS2	214	771	>gn blast evm.model.scga7_uti_cns_0161579.3 unnamed protein product	scga7_uti_cns_0161579:13029..13799	Anti-senso
WUS3	402	1414	>gn blast evm.model.scga7_uti_cns_0145700.1 unnamed protein product	scga7_uti_cns_0145700:9226..10639	Senso
WUS4	273	2815	>gn blast evm.model.scga7_uti_cns_0002006.2 unnamed protein product	scga7_uti_cns_0002006:5092..7906	Senso
WUS5	321	1167	>gn blast evm.model.scga7_uti_cns_0132424.1 unnamed protein product	scga7_uti_cns_0132424:4614..5780	Senso
WUS6	230	973	>gn blast evm.model.scga7_uti_cns_0170734.3 unnamed protein product	scga7_uti_cns_0170734:23816..24788	Senso
WUS7	262	889	>gn blast evm.model.scga7_uti_cns_0117953.1 unnamed protein product	scga7_uti_cns_0117953:6206..7094	Anti-senso
BBM2	689	4152	>gn blast evm.model.scga7_uti_cns_0342418.1 unnamed protein product	scga7_uti_cns_0342418:2504..6655	Anti-senso
BBM4	601	3715	>gn blast evm.model.scga7_uti_cns_0334373.1 unnamed protein product	scga7_uti_cns_0334373:210..3924	Senso
BBM5	699	3780	>gn blast evm.model.scga7_uti_cns_0154362.1 unnamed protein product	scga7_uti_cns_0154362:2758..6537	Senso
BBM7	433	2073	>gn blast evm.model.scga7_uti_cns_0079840.2 unnamed protein product	scga7_uti_cns_0079840:12421..14493	Anti-senso

Tabela suplementar 4: Porcentagem de identidade das proteínas de WUSCHEL (WUS) dentro de seus respectivos grupos com base nas árvores filogenéticas geradas pelo software MEGAX. A matriz de identidade foi gerada a partir dos softwares CLUSTALW e CLUSTAL Omega.

WUS (Grupo 1)	Matriz de identidade (%)	
	SP803280WUS5	SspontWUS5
ZmWUS2	79,67	80,13
ZmWUS1	85,25	84,33
SbWUS5	91,94	91,15
SP803280WUS5	100	99,37
SspontWUS5	99,37	100
WUS (Grupo 2)	Matriz de identidade (%)	
	SP803280WUS1	SspontWUS1
ZmWOX2	64,86	76,01
SbWUS	90,91	90,48
SP803280WUS1	100	97,53
SspontWUS1	97,53	100
WUS (Grupo 3)	Matriz de identidade (%)	
	SP803280WUS7	SspontWUS7
ZmWOX3A	93	93,41
SbWUS7	96,11	96,51
SP803280WUS7	100	98,09
SspontWUS7	98,09	100
WUS (Grupo 4)	Matriz de identidade (%)	
	SP803280WUS2	SspontWUS2
ZmWOX5	88,63	87,44
ZmWOX9	89,81	88,61
SbWUS2	98,59	95,69
SP803280WUS2	100	97,14
SspontWUS2	97,14	100
WUS (Grupo 5)	Matriz de identidade (%)	
	SP803280WUS6	SspontWUS6
SiWOX4	82,24	83,02
ZmWOX4	85,24	86,61
ZmWOX	80	81,19
SbWUS6	91,74	92,11
SP803280WUS6	100	99,12
SspontWUS6	99,12	100
WUS (Grupo 6)	Matriz de identidade (%)	
	SP803280WUS3	SspontWUS3
ZmWOX7	42,66	72,91
SbWUS3	43,58	87
SspontWUS3	44,08	100
SP803280WUS3	100	44,08
Sequências isoladas	Matriz de identidade (%)	
	SP803280WUS4	SspontWUS4
ZmWOX8	92,62	88,28
SbWUS4	94,83	91,02
SP803280WUS4	100	94,96
SspontWUS4	94,96	100

Tabela suplementar 5: Porcentagem de identidade das proteínas de VIVIPAROUS1 (VP1) dentro de seus respectivos grupos com base nas árvores filogenéticas geradas pelo software MEGAX. A matriz de identidade foi gerada a partir dos softwares CLUSTALW e CLUSTAL Omega.

VP1 (Grupo 1)	Matriz de identidade (%)			
	SspontVP1.2	sp803280vp1.1	SspontVP1.1	
SspontVP1.2	100	83,87	85	
ZmVP1.1	74,64	87,63	87,07	
SbVP1.1	78,25	91,67	91,59	
SP803280VP1.1	83,87	100	98,81	
SspontVP1.1	85	98,81	100	
VP1 (Grupo 2)	Matriz de identidade (%)			
	SP803280VP1.4	SP803280VP1.10	SspontVP1.3	SspontVP1.4
SP803280VP1.4	100	68,94	73,9	73,9
SP803280VP1.10	68,94	100	82,1	82,02
SbVP1.2	72,73	82,12	93,3	93,24
SspontVP1.3	73,9	82,1	100	98,92
SspontVP1.4	73,9	82,03	98,92	100
VP1 (Grupo 3)	Matriz de identidade (%)			
	SspontVP1.5			
ZmVP1.3	87,3			
ZmVP1.4	87,23			
ZmVP1.2	91,22			
ZmRAV1	91,27			
SbVP1.3	93,5			
SspontVP1.5	100			

Tabela suplementar 6: Porcentagem de identidade das proteínas de AGAMOUS-LIKE (AGL) e LEAFY-COTYLEDON (LEC) dentro de seus respectivos grupos com base nas árvores filogenéticas geradas pelo software MEGAX. A matriz de identidade foi gerada a partir dos softwares CLUSTALW e CLUSTAL Omega.

AGL (Grupo 1)	Matriz de identidade (%)	
	SP803280AGL1	SspontAGL1
SbAGL1	83	83,81
SP803280AGL1	100	98,79
SspontAGL1	98,79	100
LEC (grupo 1)	Matriz de identidade (%)	
	SP803280LEC1	SspontLEC1
ZmLECB2	82,59	82,59
ZmLEC1	84,79	85,11
ZmLECB6	84,5	85,05
SbLEC1	90,98	90,94
SP803280LEC1	100	97,74
SspontLEC1	97,74	100

Tabela suplementar 7: Porcentagem de identidade das proteínas de BABYBOOM (BBM) dentro de seus respectivos grupos com base nas árvores filogenéticas geradas pelo *software* MEGAX. A matriz de identidade foi gerada a partir dos *softwares* CLUSTALW e CLUSTAL Omega.

BBM (Grupo 1)	Matriz de identidade (%)		
	SP803280BBM5	SP803280BBM4	SspontBBM3
ZmBBM2	94,47	93,03	92,02
SbBBM	95,27	96,26	95,25
SP803280BBM5	100	96,28	95,78
SP803280BBM4	96,28	100	98,71
SspontBBM3	95,78	98,71	100
BBM (Grupo 2)	Matriz de identidade (%)		
	SspontBBM4	SspontBBM5	SP803280BBM7
SbBBMx	85,5	88,71	41,52
SspontBBM4	100	93,82	36,36
SspontBBM5	93,82	100	38,41
SP803280BBM7	36,96	38,41	100
ZmBBM2a	37,08	40,95	43,73
BBM (Grupo 3)	Matriz de identidade (%)		
	SspontBBM2	SP803280BBM2	SspontBBM1
ZmGDB	90,92	94,03	95,05
SbGDB	92,42	96,18	96,79
SspontBBM2	100	94,85	98,26
SP803280BBM2	94,85	100	98,63
SspontBBM1	98,26	98,63	100

Reaction Conditions:						
Nucleic Acid Concentration (nM)	0.25	Monovalent Concentration (mM)	50			
Free Mg ⁺⁺ Concentration (mM)	3	Total Na ⁺ Concentration (mM)	269.09			
Sense Primer: AGCGCCGCCCAAGCTTATTC						
Length (bp)	T _m (°C)	GC%	GC Clamp	Cross Dimer (ΔG)	Self Dimer (ΔG)	Hairpin (ΔG)
20	60.8	60	1	-7.2	-5.3	-1.8
Anti-sense Primer: TCGAAAGTGTGCGCGGCAAG						
Length (bp)	T _m (°C)	GC%	GC Clamp	Cross Dimer (ΔG)	Self Dimer (ΔG)	Hairpin (ΔG)
20	61.53	60	1	-7.2	-5.2	-2.0

Figura suplementar 1: Avaliação do par de *primers* da sequência SP803280AGL1 de AGL pelo *software* Beacon Designer.

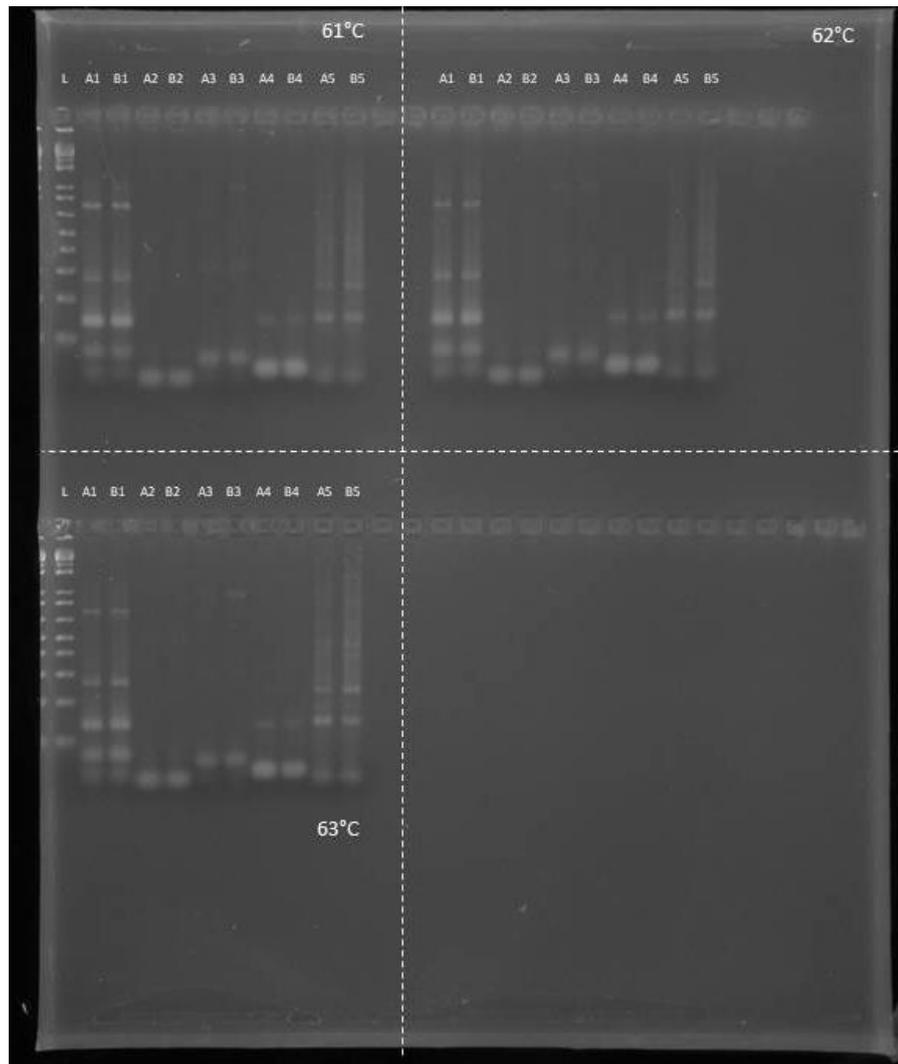


Figura suplementar 2: Amplificação em gel de agarose (3%) de *primers* da família gênica WUSCHEL em 3 temperaturas de anelamento (61°C, 62°C e 63°C). A1 e B1: WUS1a; A2 e B2: WUS2a; A3 e B3: WUS2b; A4 e B4: WUS3a; A5 e B5: WUS5b.

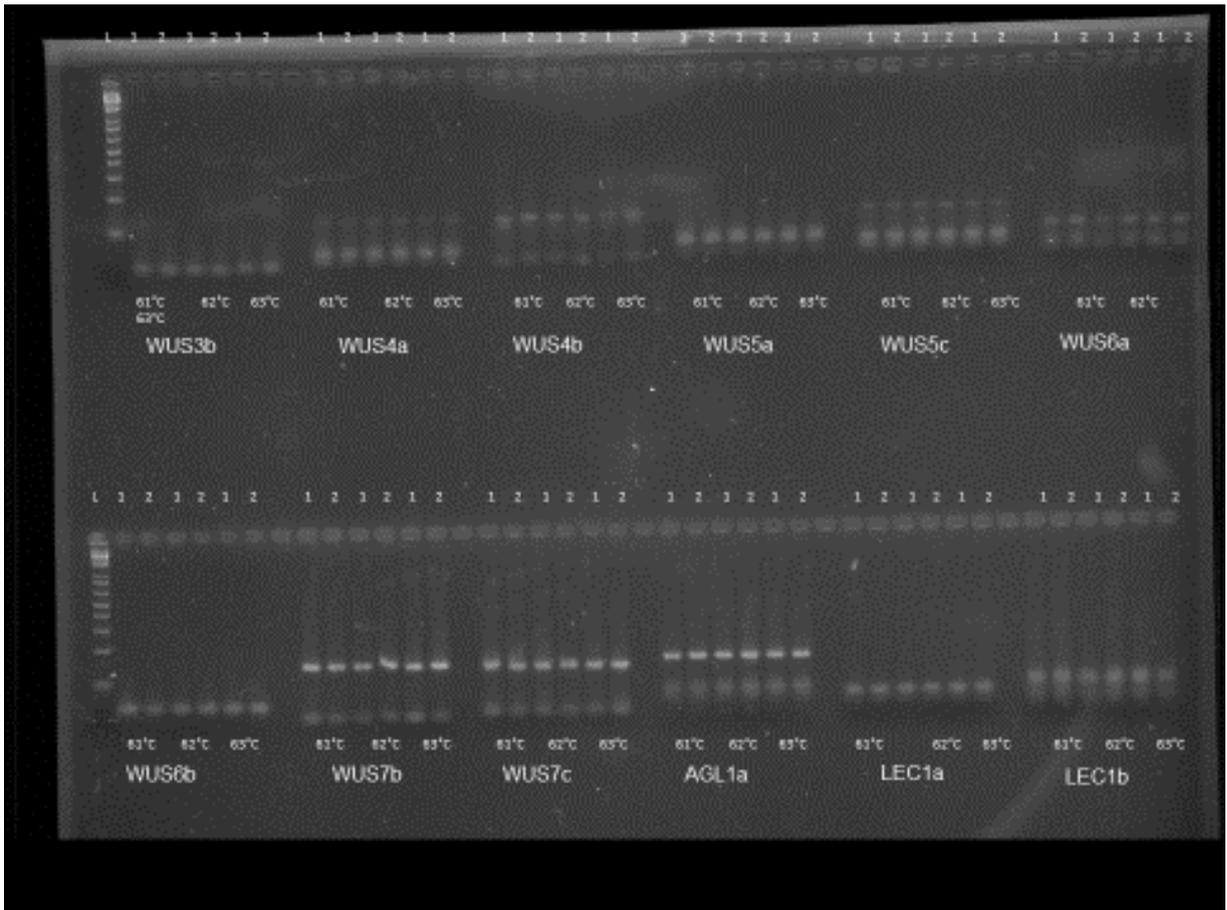


Figura suplementar 3: Amplificação em gel de agarose (3%) de *primers* das famílias gênicas WUSCHEL (WUS3b, WUS4a, WUS4b, WUS5a, WUS5c, WUS6a, WUS6b, WUS7b, WUS7c), AGAMOUS-LIKE (AGL1a) e LEAFY-COTYLEDON (LEC1a e LEC1b) em 3 temperaturas de anelamento (61°C, 62°C e 63°C).



Figura suplementar 4: Amplificação em gel de agarose (3%) de *primers* da família gênica WUSCHEL (WUS1b e WUS7a) em 3 temperaturas de anelamento (61°C, 62°C e 63°C).

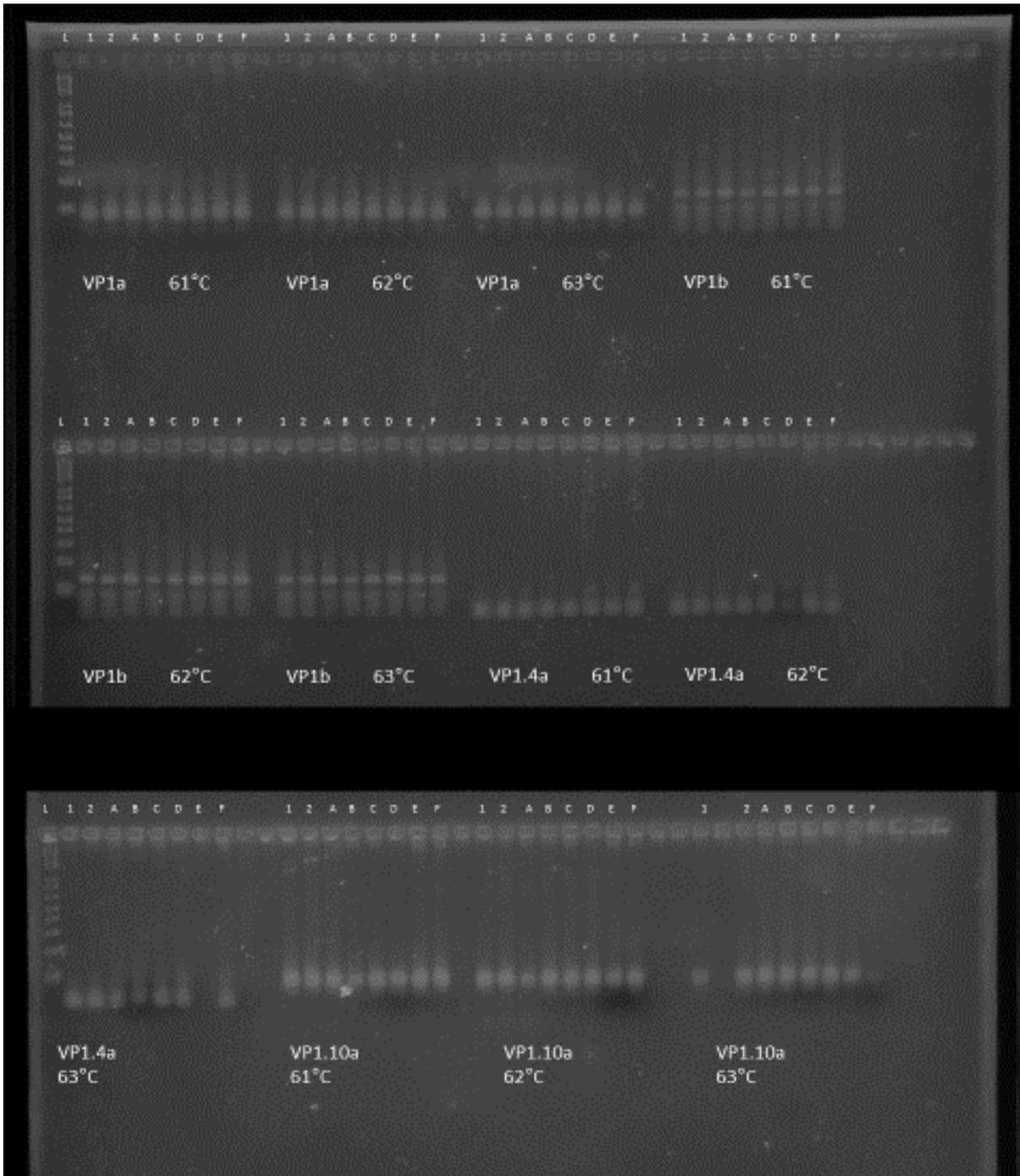


Figura suplementar 5: Amplificação em gel de agarose (3%) de *primers* da família gênica VIVIPAROUS1 (VP1a, VP1b, VP1.4a e VPQ.10a) em 3 temperaturas de anelamento (61°C, 62°C e 63°C).

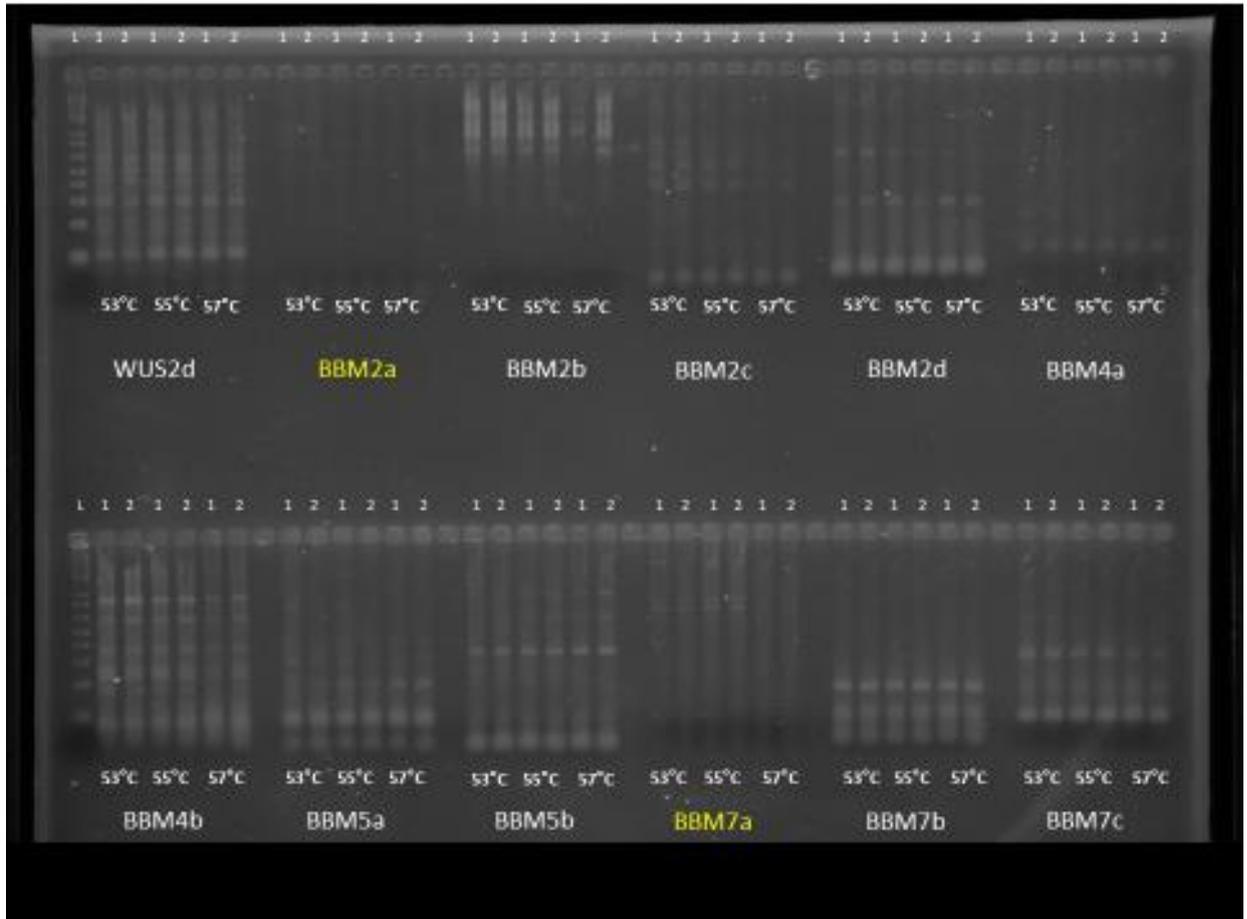


Figura suplementar 6: Amplificação em gel de agarose (3%) de *primers* da família gênica BABYBOOM (BBM2a, BBM2b, BBM2c, BBM2d, BBM4a, BBM4b, BBM5a, BBM5b, BBM7a, BBM7b e BBM7c) e WUSCHEL (WUS2d) em 3 temperaturas de anelamento (53°C, 55°C e 57°C).