



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
MELHORAMENTO DE PLANTAS**

**ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO DE CULTIVO
IN VITRO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS DA CANA-
DE-AÇÚCAR RB034045 VOLTADO À
TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA, VIA BIOBALÍSTICA,
COM O GENE *CP4-EPSPS***

CARLOS EDUARDO DE OLIVEIRA KOSIS MARTINS

Orientador:
Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov

Coorientadora:
Prof.^a Dr.^a Fabrícia de Paula Faria



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Carlos Eduardo de Oliveira Kosis Martins

3. Título do trabalho

Estabelecimento de protocolo de cultivo *in vitro* de calos embriogênicos da cana-de-açúcar RB034045 voltado à transformação genética, via biobalística, com o gene *cp4-epsps*

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Sergio Tadeu Sibov, Professora do Magistério Superior**, em 14/08/2025, às 14:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Eduardo De Oliveira Kosis Martins, Discente**, em 14/08/2025, às 16:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **5572898** e o código CRC **12ACB47C**.

CARLOS EDUARDO DE OLIVEIRA KOSIS MARTINS

**ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO DE CULTIVO *IN VITRO*
DE CALOS EMBRIOGÊNICOS DA CANA-DE-AÇÚCAR RB034045
VOLTADO À TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA, VIA
BIOBALÍSTICA, COM O GENE *CP4-EPSPS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, da Escola de Agronomia, da Universidade Federal de Goiás, como exigência para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.
Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

Orientador:

Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov

Coorientadora:

Prof.^a Dr.^a Fabrícia Paula de Faria

GOIÂNIA, GO - BRASIL

2025

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Martins, Carlos Eduardo de Oliveira Kosis
Estabelecimento de protocolo de cultivo in vitro de calos embriogênicos da cana-de-açúcar RB034045 voltado à transformação genética, via biobalística, com o gene cp4-epsps [manuscrito] / Carlos Eduardo de Oliveira Kosis Martins. - 2025.
c, 100 f.: il.

Orientador: Prof. Sérgio Tadeu Sibov; co-orientador Fabrícia Paula de Faria.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia (EA), Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Goiânia, 2025.

Bibliografia.

Inclui fotografias, gráfico, tabelas.

1. Saccharum spp.. 2. Calogênese. 3. Embriogênese. 4. Transformação gênica. I. Sibov, Sérgio Tadeu, orient. II. Título.

CDU 631/635



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

ESCOLA DE AGRONOMIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 138 da sessão de Defesa de Carlos Eduardo de Oliveira Kosis Martins, que confere o título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas, na área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas.

Aos trinta e um dias do mês de julho de dois mil e vinte e cinco, a partir das quatorze horas, em formato on-line, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada "**Estabelecimento do protocolo de cultivo in vitro de calos embriogênicos da cana-de-açúcar RB034045 voltado à transformação genética via biobalística com o gene cp4-epsps**". Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, Professor Sérgio Tadeu Sibov (PPGGMP/UFG), com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Doutora Gesimária Ribeiro Costa Coelho (Embrapa Arroz e Feijão), membro titular externo, Doutor Luciano Lajovic Carneiro (EMATER/GO), membro titular externo e Doutora Fabrícia Paula de Faria (ICB/UFG), coorientadora. Durante a arguição os membros da banca fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido o candidato **Aprovado** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

Estabelecimento de protocolo de cultivo *in vitro* de calos embriogênicos da cana-de-açúcar RB034045 voltado à transformação genética, via biobalística, com o gene *cp4-epsps*



Documento assinado eletronicamente por **LUCIANO LAJOVIC CARNEIRO, Usuário Externo**, em 12/08/2025, às 18:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **GESIMARIA RIBEIRO COSTA COELHO, Usuário Externo**, em 12/08/2025, às 20:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sergio Tadeu Sibov, Professor do Magistério Superior**, em 13/08/2025, às 14:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabricia Paula De Faria, Professor do Magistério Superior-Substituto**, em 13/08/2025, às 16:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5567166** e o código CRC **E26B04CA**.

*“Cada um de nós compõe a sua história,
cada ser em si carrega o dom de ser capaz,
de ser feliz”*

Almir Sater / Renato Teixeira

A Jesus Cristo, família e amigos

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Jesus Cristo, que me concedeu força, discernimento e disposição para seguir com dedicação neste trabalho.

À minha família, base essencial em minha trajetória, com especial gratidão aos meus pais, Mateus Martins e Rosana Kosis, pelo apoio incondicional e incentivo contínuo. E irmãos, em especial, Yan e Leonardo.

À minha esposa, Emily Martins, por caminhar ao meu lado com amor, paciência e encorajamento em todos os momentos.

Aos professores Dr. Sérgio Tadeu Sibov e Dra. Fabrícia Paula de Faria, pela orientação dedicada, incentivo constante e por acreditar neste trabalho com confiança e generosidade.

Ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (labCulTive), pelo suporte técnico e científico durante o desenvolvimento da pesquisa. Em especial, ao técnico Paulo Faria, pelo compartilhamento de conhecimento, paciência e parceria ao longo do processo, bem como os funcionários, estagiários, mestrandos e doutorandos que contribuíram direta ou indiretamente com esta jornada.

Aos amigos da pós-graduação, com destaque para Cristian e Frederico, pela colaboração, amizade e apoio mútuo ao longo do percurso acadêmico.

À Universidade Federal de Goiás (UFG), e ao Programa de pós-graduação em genética e melhoramento de plantas (PPGGMP-UFG), pelo suporte institucional e pela infraestrutura disponibilizada.

À Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (RIDESA), pela parceria e pelo fornecimento da variedade de cana-de-açúcar RB034045, essencial para a realização deste estudo.

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 CANA-DE-AÇÚCAR NO BRASIL: MELHORAMENTO E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA.....	16
2.2 BIOTECNOLOGIA VEGETAL APLICADA À CANA-DE-AÇÚCAR....	18
2.3 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA: BIOBALÍSTICA.....	21
2.4 O GENE <i>CP4-EPSPS</i> E A RESISTÊNCIA AO GLIFOSATO.....	23
2.5 CULTURA DE TECIDOS NA CANA-DE-AÇÚCAR: FUNDAMENTOS, APLICAÇÕES E DESAFIOS.....	24
2.6 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA.....	26
2.7 CALOGÊNESE.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 CALOGÊNESE: PROTOCOLO INICIAL.....	29
3.1.1 Explante.....	30
3.1.2 Descontaminação.....	31
3.1.3 Cultivo dos explantes e indução de calos.....	32
3.1.4 Meio de cultura para indução de calos.....	32
3.1.5 Subcultivo dos calos.....	33
3.2 CALOGÊNESE: ENSAIOS DE OTIMIZAÇÃO.....	33
3.2.1 Explante: Influência das regiões do tolete cilíndrico apical na morfogênese <i>in vitro</i>	33
3.2.2 Descontaminação: Otimização do protocolo para redução da contaminação <i>in vitro</i>	35
3.3 REGENERAÇÃO DE PLANTAS.....	35
3.3.1 Meio de cultura para regeneração de plantas.....	36
3.4 REGENERAÇÃO DE PLANTAS: ENSAIO DE OTIMIZAÇÃO.....	36
3.4.1 Meio de cultura para regeneração de plantas: Efeito da suplementação na eficiência regenerativa.....	36

3.4.2	Concentração inibitória mínima de canamicina na regeneração de plantas.....	37
3.5	DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS EM MEIO LÍQUIDO.....	37
3.6	BIOBALÍSTICA.....	38
3.6.1	Precipitação do DNA nas micropartículas.....	38
3.6.2	Preparo dos calos.....	39
3.6.3	Bombardeamento gênico.....	39
3.6.4	Repique dos calos após bombardeados.....	40
3.6.5	Análise da integração dos genes <i>cp4-epsps</i> e <i>nptII</i> no genoma da cana-de-açúcar via PCR.....	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1	PROTOCOLO INICIAL DE CALOGÊNESE.....	41
4.2	ENSAIOS DE OTIMIZAÇÃO DA CALOGÊNESE.....	51
4.2.1	Explante: Influência das regiões do tolete cilíndrico apical na morfogênese in vitro.....	51
4.2.2	Descontaminação: Otimização do protocolo para redução da contaminação in vitro.....	59
4.2.2.1	Uso do hipoclorito de sódio a 2,5%.....	60
4.2.2.2	Protocolo de dupla desinfecção.....	60
4.2.2.3	Redução do número de explantes por frasco.....	62
4.3	REGENERAÇÃO DE PLANTAS.....	66
4.3.1	Meio de cultura para regeneração de plantas: Efeito da suplementação na eficiência regenerativa.....	69
4.3.2	Concentração inibitória mínima de canamicina na regeneração.....	74
4.4	DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS EM MEIO LÍQUIDO.....	77
4.5	BIOBALÍSTICA: RESULTADOS GERAIS.....	78
4.5.1	Confirmação molecular da integração do gene <i>cp4-epsps</i> no genoma da cana-de-açúcar pós biobalística.....	84
5	CONCLUSÕES.....	86
6	REFERÊNCIAS.....	88

RESUMO

MARTINS, C. E. O. K. **Estabelecimento de protocolo de cultivo *in vitro* de calos embriogênicos da cana-de-açúcar RB034045 voltado à transformação genética, via biobalística, com o gene *cp4-epsps***. 2025. 99 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) -Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2025.¹

A embriogênese somática é uma ferramenta fundamental no melhoramento genético da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), especialmente em protocolos de transformação genética. Entretanto, limitações como a contaminação endofítica e a resposta *in vitro* variável entre genótipos ainda comprometem sua eficiência. Este trabalho teve como objetivo estabelecer e otimizar um protocolo de embriogênese somática indireta para a variedade RB034045, bem como conduzir experimentos de transformação genética via biobalística como etapa de validação do sistema, utilizando o gene de interesse *cp4-epsps*, associado à resistência ao herbicida glifosato. O protocolo foi desenvolvido a partir de discos foliares do tolete cilíndrico apical, cultivados em meio contendo ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) para indução e multiplicação de calos embriogênicos, seguido por etapas de regeneração e desenvolvimento de plantas. A partir desse sistema base, foram realizados ensaios de otimização abordando três aspectos críticos: contaminação endofítica, composição do meio de regeneração e escolha da região do explante mais adequada. Estratégias como o uso de hipoclorito de sódio a 2,5%, associado à redução da quantidade de material vegetal por frasco a ser descontaminado, mostraram-se eficazes na redução da contaminação. Os melhores resultados de regeneração foram obtidos com a suplementação do meio com água de coco (77,7%) e 6-benzilaminopurina (BAP) (75,8%). A região basal do tolete superior vegetal destacou-se por apresentar maior eficiência de calogênese e rendimento embriogênico. A concentração inibitória mínima de canamicina para seleção das plantas transformadas com o gene marcador *nptII*, foi fixada em 100 mg L⁻¹. Na etapa de validação, calos embriogênicos foram submetidos à transformação genética via biobalística, com o vetor contendo os genes *cp4-epsps* e *nptII*, e cultivados sob pressão seletiva. As plântulas regeneradas apresentaram fenótipo aclorofilado e baixo vigor vegetativo. As análises por PCR demonstraram que o gene *nptII* do vetor foi integrado no genoma da cana e que a integração do gene *cp4-epsps* não ocorreu, estes resultados confirmam a transformação do calo, porém com integração parcial do vetor no genoma da cana. Os resultados demonstram a viabilidade do protocolo de embriogênese somática desenvolvido para a variedade RB034045 e seu potencial de aplicação em estratégias de transformação genética, com perspectivas para aprimoramentos futuros visando à obtenção de eventos transgênicos estáveis.

Palavras-chave: *Saccharum* spp., calogênese, embriogênese, transformação gênica.

Orientador: Dr. Sérgio Tadeu Sibov, ICB-UFG.

Coorientadora: Dra. Fabricia Paula de Faria, ICB-UFG.

ABSTRACT

MARTINS, C. E. O. K. **Establishment of an *in vitro* culture protocol for embryogenic calli of sugarcane RB034045 aimed at genetic transformation, via biolistics, using the *cp4-epsps* gene.** 2025. 99 f. Dissertation (Master's in Genetics and Plant Breeding) – School of Agronomy, Federal University of Goiás, Goiânia, 2025.

Somatic embryogenesis is a key tool in the genetic improvement of sugarcane (*Saccharum spp.*), particularly in protocols involving genetic transformation. However, limitations such as endophytic contamination and the highly variable *in vitro* response among genotypes still hinder its efficiency. This study aimed to establish and optimize an indirect somatic embryogenesis protocol for the RB034045 variety, as well as to perform genetic transformation experiments via biolistics as a validation step, using the *cp4-epsps* gene, associated with glyphosate resistance, as a selectable marker. The initial protocol was developed using leaf roll explants from the shoot apical region, cultivated in medium containing 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) for induction and multiplication of embryogenic calli, followed by regeneration and plant development steps. Based on this system, optimization experiments were conducted focusing on three critical aspects: endophytic contamination, efficiency of the regeneration medium composition, and explant region suitability. Strategies involving 2.5% sodium hypochlorite combined with reduced plant tissue per flask effectively decreased contamination levels. Regarding regeneration, the best results were obtained with medium supplemented with coconut water (77.7%) and 6-benzylaminopurine (BAP) (75.8%). The basal region of the cylindrical leaf stalk stood out for its higher callogenesis efficiency and embryogenic yield. Additionally, the minimum inhibitory concentration of kanamycin for effective selection was determined to be 100 mg L⁻¹. For validation, embryogenic calli were subjected to biolistic transformation using a construct carrying the *cp4-epsps* gene and subsequently cultured under selective pressure. Regenerated plantlets exhibited an albino phenotype and low vegetative vigor. PCR analysis did not detect the *cp4-epsps* gene, although amplification of the *nptII* gene was observed, confirming partial integration of the transgene. The results demonstrate the feasibility of the somatic embryogenesis protocol developed for the RB034045 variety and its potential application in genetic transformation strategies, with prospects for optimization toward the generation of stable transgenic events.

Keywords: *Saccharum* spp., callogenesis, embryogenesis, genetic transformation.

Adviser: Dr. Sérgio Tadeu Sibov, ICB-UFG.

Co-advisor: Dra. Fabrícia Paula de Faria, ICB-UFG.

1 INTRODUÇÃO GERAL

A cana-de-açúcar é reconhecida por sua importância na produção de açúcar e energia. Sua relevância econômica e ambiental se deve, principalmente, à capacidade de adaptação a diferentes condições edafoclimáticas (Heinrichs et al., 2017). Além disso, apresenta maior produtividade em regiões tropicais, com alta umidade e solos férteis, o que justifica sua consolidação em países como o Brasil (Soares et al., 2013).

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab, 2025), no 3º levantamento da Safra 2024/25, o Brasil produziu 678,67 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, com 8,7 milhões de hectares de área de colheita. Esse contexto justifica o contínuo investimento em pesquisa, com o objetivo de atender às demandas do mercado e promover avanços no desenvolvimento do cultivo da cana-de-açúcar no Brasil. Tais esforços têm contribuído para a manutenção da cultura em posição de destaque no cenário agrícola nacional.

O setor sucroalcooleiro brasileiro conta com instituições de grande relevância, responsáveis pelo desenvolvimento de variedades e tecnologias aplicadas ao cultivo da cana (De Carvalho & Furtado, 2013). Dentre essas instituições, destacam-se a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), o Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) e, especialmente, a Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (RIDESA), que se destaca pelo desenvolvimento de variedades RB, altamente adaptadas às condições ambientais brasileiras. Essas cultivares ocupam mais de 65% da área cultivada com cana-de-açúcar no país e contribuem com cerca de 12,3% da matriz energética nacional (Ridesa, 2010).

As variedades de cana-de-açúcar são amplamente estudadas em programas de melhoramento genético no Brasil. Dada sua importância econômica, há um esforço contínuo para adaptá-las às mudanças climáticas, aumentar sua produtividade, torná-las mais tolerantes à mecanização e resistentes a pragas e doenças (Demetrio et al., 2008; De Carvalho & Furtado, 2013; Guo, et al, 2015; Harter, 2018; Cunha & Gomes, 2021). Entretanto, fatores como baixa fertilidade, alta suscetibilidade a doenças, o longo tempo necessário para o

desenvolvimento de cultivares elite e a complexidade genética (poliploidia e aneuploidia) ainda representam obstáculos significativos para o sucesso dos programas de melhoramento genético (Lakshmanan et al., 2005).

Diante dessas limitações, cresce o uso de ferramentas da biotecnologia, como a cultura de tecidos vegetais, que oferece suporte ao melhoramento convencional e molecular. Essa técnica é essencial tanto para a propagação clonal, como para a obtenção de mudas livres de patógenos e conservação de germoplasma, além de ser a base para a regeneração de plantas geneticamente transformadas (Alves et al., 2008; Barrell et al., 2011).

Frente as abordagens da cultura de tecidos, a embriogênese somática destaca-se por sua eficiência na multiplicação celular e pela viabilidade de transformação genética (Handro; Floh, 1990; Barros, 1999). A via indireta é a mais utilizada nesse processo, caracterizada pela formação de calos como estágio intermediário. A calogênese, desdiferenciação do tecido inicial em calo, é uma etapa fundamental tanto para a regeneração de plantas quanto para a aplicação de técnicas de transformação genética, como a biobalística e pela bactéria *Agrobacterium tumefaciens* (Gelvin, 2003; Venturieri & Venturieri, 2004).

A biotecnologia moderna tem ampliado as possibilidades do melhoramento genético ao permitir a introdução direta de genes no genoma vegetal. Técnicas como a engenharia genética tornam possível modificar características específicas, como resistência a herbicidas, pragas, estresses ambientais e até mesmo melhorar o valor nutricional das culturas (Cursi et al., 2021).

A eficiência da transformação genética da cana-de-açúcar ainda é limitada pelos desafios impostos pela complexidade genética da cana-de-açúcar, vários estudos têm sido realizados com o objetivo de aumentar a eficiência e promover maior reprodutibilidade da transformação (Da Silva et al., 2011; Fregonesi, 2021; Politano, 2021; Caixeta & Da Cunha, 2024). O sucesso dessas estratégias depende da capacidade de regeneração de plantas completas a partir de células transformadas, viabilizada pela totipotência celular explorada na cultura de tecidos (Torres et al., 1999).

A regeneração de plântulas a partir de calos embriogênicos é uma etapa crítica em protocolos de embriogênese somática, especialmente em estratégias de transformação genética, como a biobalística. Como apenas uma fração dos calos incorpora o transgene, é essencial maximizar a taxa de regeneração para garantir a seleção eficiente dos transformantes.

Este trabalho teve como objetivo geral estabelecer um protocolo eficiente de cultivo *in vitro* para a variedade de cana-de-açúcar RB034045, com ênfase na indução e regeneração de calos embriogênicos competentes para transformação genética via biobalística. A escolha dessa variedade deve-se à sua relevância agrônômica, aliada à escassez de dados disponíveis na literatura científica quanto à sua resposta morfogênica em condições *in vitro*, especialmente no que se refere à competência embriogênica. Diante dessa lacuna, tornou-se necessária a elaboração de um protocolo inicial adaptado às características específicas da cultivar, seguido da otimização de parâmetros experimentais relacionados ao processo de embriogênese somática.

Para alcançar esse objetivo, o estudo foi conduzido em duas etapas principais. A primeira consistiu na avaliação e otimização de fatores determinantes para a indução de calos embriogênicos e sua posterior regeneração em plântulas, considerando variáveis como tipo de explante, composição do meio de cultura e métodos de desinfestação. A segunda etapa correspondeu à aplicação da técnica de transformação genética via biobalística em calos previamente induzidos, como forma de validar a eficiência do protocolo de cultivo *in vitro* desenvolvido. Nesta fase, foram utilizados os genes *cp4-epsps* e *nptII* como marcadores, com o objetivo de viabilizar a obtenção de eventos de transformação e, potencialmente, gerar plantas geneticamente modificadas.

Espera-se que os resultados obtidos contribuam significativamente para o aprimoramento de protocolos de transformação genética em cana-de-açúcar, promovendo maior eficiência, reprodutibilidade e aplicabilidade das técnicas biotecnológicas no melhoramento dessa cultura de elevada importância econômica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CANA-DE-AÇÚCAR NO BRASIL: MELHORAMENTO E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

Pertencente à família Poaceae, a cana-de-açúcar exerce um papel estratégico na produção global de açúcar, sendo responsável por mais da metade do açúcar bruto consumido mundialmente, além de consolidar-se como matéria-prima essencial para a produção de bioetanol. Embora seja cultivada em diversas regiões do mundo, destaca-se particularmente no Brasil, país que reúne condições edafoclimáticas favoráveis, ampla disponibilidade de terras agricultáveis e uma sólida estrutura produtiva, configurando-se como um dos principais polos de produção e inovação relacionados à cultura (Moraes et al., 2016; O'Connell et al., 2022).

A multiplicação da cana-de-açúcar ocorre, predominantemente, por propagação vegetativa, por meio de segmentos do colmo. No entanto, os programas de melhoramento genético utilizam a reprodução sexuada com o objetivo de gerar cultivares mais adaptadas a diferentes condições ambientais. A planta apresenta crescimento em forma de touceiras, compostas por colmos, folhas e estruturas reprodutivas. Sua ampla variabilidade genética, associada à notável adaptabilidade a distintas condições edafoclimáticas, favorece sua ampla distribuição geográfica (Dillon et al., 2007; Zhang et al., 2012; Santos & Borém, 2016).

No contexto nacional, a cultura da cana-de-açúcar ocupa posição de destaque, constituindo um dos pilares da economia brasileira. O Brasil lidera a produção mundial, com colheitas que ultrapassam 700 milhões de toneladas por safra. Além de sua importância para a produção de açúcar e etanol, a cultura desempenha papel estratégico na matriz energética brasileira, consolidando-se como uma fonte relevante de energia renovável. Segundo Goldemberg et al. (2018), o etanol derivado da cana substitui combustíveis fósseis, reduzindo a emissão de gases de efeito estufa e contribuindo para a sustentabilidade do setor energético nacional.

Entretanto, o desempenho agrônômico da cana-de-açúcar é limitado por diversos fatores, entre os quais se destacam infestações por pragas, como a broca-da-cana, doenças de origem bacteriana e fúngica, competição com plantas daninhas e estresses abióticos, como seca e variações térmicas, os quais impactam negativamente a produtividade e a sustentabilidade do cultivo (Gonçalves et al., 2012; Santana, 2011).

Até o final do século XIX, as variedades cultivadas eram predominantemente clones de *Saccharum officinarum*, espécie domesticada a partir de *S. robustum* (Daniels & Roach, 1987). A introdução de cruzamentos com *Saccharum spontaneum* marcou um avanço significativo nos programas de melhoramento, resultando em híbridos com maior produtividade e resistência. Os retrocruzamentos com *S. officinarum* possibilitaram a obtenção de genótipos com maiores teores de açúcar e maior resistência a pragas e doenças, reforçando a importância contínua da estratégia de cruzamentos para o melhoramento da cultura de cana-de-açúcar (Aitken, 2022).

Historicamente, o melhoramento da cana-de-açúcar foi pautado por métodos convencionais, como seleção massal e cruzamentos controlados, com foco na obtenção de genótipos superiores. Nesse contexto, destaca-se a atuação da Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (RIDESA), criada em 1990 com o objetivo de fomentar pesquisas voltadas ao melhoramento genético e à biotecnologia, entre outras áreas correlatas (RIDESA, 2010). Com a extinção do PLANALSUCAR, a RIDESA estruturou um modelo de apropriação de cultivares, assegurando exclusividade sobre as tecnologias desenvolvidas.

De acordo com Da Silva et al. (2014), os programas de melhoramento coordenados pela RIDESA resultaram na introdução de variedades mais produtivas e de maior qualidade, reafirmando sua importância estratégica no avanço da canavicultura nacional. Um exemplo notável é a variedade RB034045, desenvolvida pela Universidade Federal de Goiás, que se sobressai pelo alto perfilhamento, crescimento acelerado e elevado teor de fibras. Medrado et al. (2023), por exemplo, demonstrou que, mesmo sob condições adversas, essa cultivar mantém elevada produtividade e expressivo desenvolvimento radicular.

Adicionalmente, a RB034045 apresenta excelente capacidade de brotação e eficiente fechamento de entrelinhas, características que favorecem o desempenho agrícola e a competitividade da cultura. Assim, os avanços promovidos pela RIDESA são fundamentais

para a superação dos desafios do setor, contribuindo para a elevação da produtividade e da sustentabilidade.

De modo geral, os programas de melhoramento convencional, conduzidos tanto por instituições públicas quanto privadas, têm como objetivo o desenvolvimento de variedades mais adaptadas às condições edafoclimáticas brasileiras, com maior teor de sacarose, resistência a pragas e doenças, e melhor desempenho em sistemas de mecanização e colheita sem queima (Morais et al., 2015). No entanto, apesar de eficazes, essas abordagens tradicionais demandam longos períodos e múltiplos ciclos de seleção para a obtenção de cultivares agronomicamente superiores (Ahmar et al., 2020; Kandel et al., 2018).

A complexidade do genoma da cana-de-açúcar impõe desafios adicionais à aplicação dos métodos convencionais. Isso se deve ao fato de que as variedades modernas são oriundas de hibridações entre *Saccharum officinarum* e *S. spontaneum*, espécies que apresentam alta poliploidia, aneuploidia e variação cromossômica, totalizando entre 100 e 130 cromossomos (Dijoux et al., 2024).

O alto grau de complexidade genética da cana compromete a precisão e a eficiência dos processos de seleção e fixação de características agrônomicas desejáveis. Em genomas altamente poliploides e aneuploides, é difícil garantir a manutenção simultânea de múltiplos alelos de interesse, o que dificulta a introgressão de genes específicos sem perdas em outras características agronomicamente vantajosas.

Nesse cenário, a biotecnologia representa uma ferramenta estratégica para superar essas limitações, oferecendo alternativas mais precisas e eficientes. Técnicas como a transformação genética, associadas ao cultivo *in vitro* e à cultura de tecidos, permitem a introdução direta de genes de interesse, acelerando o desenvolvimento de genótipos superiores e aprimorando características específicas, como resistência a pragas, tolerância a estresses abióticos e resistência a herbicidas.

Além disso, técnicas moleculares, como a edição gênica, o uso de marcadores moleculares e a genômica funcional, vêm sendo incorporadas às estratégias de melhoramento, tornando o processo mais eficiente, direcionado e alinhado às demandas da agricultura sustentável e da indústria sucroenergética (Ahmar et al., 2020).

2.2 BIOTECNOLOGIA VEGETAL APLICADA À CANA-DE-AÇÚCAR

A biotecnologia vegetal compreende um conjunto de técnicas avançadas que possibilitam a manipulação genética e fisiológica das plantas, com o objetivo de aprimorar características agronomicamente desejáveis. No caso da cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), essas ferramentas vêm desempenhando um papel central no desenvolvimento de cultivares mais produtivas, resistentes a pragas e tolerantes a estresses ambientais (Brito, 2014; Ferreira et al., 2017; Shabbir et al., 2021).

Entre as abordagens mais relevantes destaca-se a cultura de tecidos, que serve como base para os sistemas de transformação genética, incluindo os métodos mediados por *A. tumefaciens* e por biobalística. Essas técnicas viabilizam a introdução direta e indireta de genes de interesse em genótipos de elite, reduzindo significativamente o tempo necessário para o desenvolvimento de novas variedades e permitindo a incorporação precisa de características específicas. Embora apresentem limitações, como baixa eficiência de transformação e recalcitrância de alguns genótipos, essas estratégias representam alternativas mais rápidas e direcionadas em comparação aos métodos convencionais de melhoramento, especialmente no que se refere à introdução de genes específicos sem a necessidade de múltiplas gerações de retrocruzamentos (Heleodoro et al., 2018).

A utilização de ferramentas de biotecnologia é especialmente relevante para superar os desafios impostos pela complexidade genética da cana-de-açúcar e para acelerar o processo de obtenção de genótipos superiores (Cursi et al., 2021). Um dos primeiros exemplos bem-sucedidos de aplicação foi demonstrado por Ingelbrecht et al. (1999), que relataram a resistência viral em cana-de-açúcar transgênica por meio do silenciamento gênico pós-transcricional via RNA, evidenciando o potencial dessas tecnologias mesmo em culturas poliploides e de genoma complexo.

Como citado acima, persistem entraves técnicos que limitam o avanço dos métodos tradicionais de melhoramento, como a baixa fertilidade, os longos ciclos de desenvolvimento, a recalcitrância de determinados genótipos e a suscetibilidade a fitopatógenos (Snyman et al., 2006). Diante disso, torna-se imprescindível expandir o uso da cultura de tecidos e da propagação *in vitro*, as quais fornecem suporte essencial não apenas à multiplicação de genótipos de interesse, mas também aos processos de transformação genética e regeneração de plantas com características superiores (Lakshmanan et al., 2005).

Avanços significativos vêm sendo alcançados na geração de variedades transgênicas com resistência a insetos e pragas. Entre essas, destaca-se a cana Bt, que

expressa genes do grupo *Cry*, oriundos da bactéria *Bacillus thuringiensis*. As proteínas *Cry* são toxinas que atuam como bioinseticidas naturais, promovendo a lise do epitélio intestinal dos insetos-alvo após ingestão. As cultivares comerciais CTC20BT e CTC9001BT, por exemplo, foram geneticamente modificadas para produzir a proteína *Cry1Ac*, conferindo proteção eficaz contra a broca-da-cana (*Diatraea saccharalis*) e a broca-gigante (*Telchin licus*), ambas de difícil controle em sistemas convencionais (Budeguer et al., 2021; Gitahy et al., 2007; Lopes et al., 2022; Sakuno et al., 2024).

A adoção dessas cultivares tem contribuído significativamente para a redução das perdas de produtividade e da dependência de defensivos químicos, representando um avanço tanto em termos agronômicos quanto ambientais. A liberação comercial da cana Bt também ilustra o funcionamento do sistema regulatório brasileiro voltado aos organismos geneticamente modificados (OGMs), que se baseia em critérios como a equivalência substancial e a avaliação rigorosa de riscos (Pizella & De Souza, 2016).

Além do controle de pragas, a biotecnologia tem viabilizado o desenvolvimento de cultivares adaptadas a condições ambientais adversas. Pesquisas voltadas à tolerância ao alumínio, comum em solos ácidos como os do Cerrado brasileiro, têm gerado resultados promissores (Brito, 2014; Ribeiro et al., 2021; Ribeiro, 2016; Rosa-Santos et al., 2020). Da mesma forma, esforços para aumentar a resistência ao estresse hídrico vêm ganhando destaque, dada a crescente instabilidade climática e seus impactos sobre a produtividade agrícola (Dlamini, 2021; Ramiro et al., 2016; Verma et al., 2022).

A seleção de plantas geneticamente transformadas geralmente envolve o uso de genes marcadores de resistência a antibióticos ou herbicidas, que permitem identificar as células com o transgene integrado no genoma. A confirmação da transformação é realizada por meio de técnicas moleculares como a amplificação do gene de interesse e gene marcador via reação em cadeia da polimerase (PCR) e o *Southern blot*, que detectam a integração do transgene no genoma da planta (Aitken, 2022; Brasileiro, 1998).

No contexto dos biocombustíveis, a engenharia genética também oferece contribuições relevantes, especialmente para a produção de etanol de segunda geração (2G). Um exemplo é a modificação na composição da parede celular, por meio da introdução de genes específicos que podem aumentar a liberação de açúcares fermentáveis durante o processamento da biomassa, otimizando a conversão em etanol e ampliando o aproveitamento energético dos resíduos lignocelulósicos (Mohan et al., 2022). Tais

inovações são cruciais para a sustentabilidade da matriz energética e para a mitigação das emissões de gases de efeito estufa (Joshi et al., 2022; Li et al., 2014).

Mais recentemente, tecnologias de edição gênica, como o sistema CRISPR/Cas9, vêm sendo exploradas como ferramenta de alta precisão para o melhoramento genético da cana-de-açúcar. Esses sistemas permitem modificações específicas no genoma, acelerando o desenvolvimento de cultivares com características agronomicamente superiores (Hussin et al., 2022).

Entre as aplicações já documentadas, destaca-se a edição do gene *MgCh* (quelatase de magnésio), que resultou em plantas com folhas verde-amarelas, fornecendo um marcador fenotípico visualmente detectável para identificação de eventos de edição gênica (Eid et al., 2021; Zhou et al., 2024). Outro exemplo é a edição do gene *ALS* (acetolactato sintase), que conferiu resistência a herbicidas por meio de mutações específicas (Kumar et al., 2024). Adicionalmente, intervenções na arquitetura foliar, como a modificação da posição das folhas, também foram alcançadas via CRISPR/Cas9, contribuindo para o aumento da produção de biomassa (Ghane et al., 2024).

Dessa forma, o contínuo avanço das técnicas de biotecnologia aplicadas à cana-de-açúcar abre novas perspectivas para o aprimoramento genético da cultura, oferecendo soluções eficazes para os desafios da agricultura moderna e assegurando sua competitividade e sustentabilidade.

2.3 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA: BIOBALÍSTICA

A transformação genética via biobalística, também denominada bombardeamento de partículas, constitui uma das técnicas mais amplamente empregadas na engenharia genética de plantas. Essa abordagem tem se mostrado especialmente relevante em espécies recalcitrantes à transformação mediada por *A. tumefaciens*, como é o caso da cana-de-açúcar (Rashid & Lateef, 2016).

O método baseia-se na introdução direta de DNA exógeno em células vegetais por meio de micropartículas metálicas, geralmente de ouro ou tungstênio, revestidas com DNA. Essas partículas são aceleradas em direção ao tecido-alvo por um dispositivo de propulsão, permitindo que penetrem as barreiras celulares sem induzir letalidade significativa. Uma vez no citoplasma, o DNA é liberado das partículas, podendo integrar-se no genoma da célula hospedeira e ser posteriormente expresso (Da Silva et al., 2011).

Os primeiros registros do uso dessa técnica em cana-de-açúcar são do estudo pioneiro de Bower & Birch (1992), que introduziu o gene *nptII*, marcador de resistência aos antibióticos canamicina e geneticina via biobalística em cana-de-açúcar. Os resultados deste estudo têm impulsionado o desenvolvimento de variedades transgênicas com características agronomicamente desejáveis como cultivares com resistência a pragas, como as que expressam genes Cry contra a broca-da-cana (*Diatraea saccharalis*) (Zhou, 2018), bem como variedades com tolerância a estresses abióticos, herbicidas e vírus (Molinari et al., 2007; Zhang et al., 1999; Manickavasagam et al., 2004; Butterfield et al., 2002).

Contudo, apesar de sua ampla aplicabilidade, a biobalística apresenta desafios consideráveis. Entre eles, destacam-se a baixa eficiência de transformação, a integração aleatória do gene no genoma e frequentemente múltiplas cópias do transgene, o que pode resultar em silenciamento gênico e variabilidade fenotípica (Van Der Vyver et al., 2010; Elliot et al., 1998). A eficácia do processo está diretamente relacionada a múltiplos fatores, como o tipo e o estado fisiológico do calo, a homogeneidade do material vegetal, os parâmetros físicos do disparo e a resposta celular ao agente seletivo (Anderson & Birch, 2012).

Apesar dessas limitações, a biobalística permanece como uma ferramenta valiosa para o melhoramento genético da cana-de-açúcar, sendo particularmente vantajosa para a inserção de genes em variedades comerciais de alto desempenho, onde métodos alternativos, como a transformação via *Agrobacterium*, enfrenta restrições. Diversos sistemas biobalísticos demonstraram eficiência na transformação de diferentes cultivares comerciais, mesmo diante da complexidade genômica da espécie. Alguns estudos como os de Ramasamy et al. (2018) têm aperfeiçoado os protocolos existentes, ampliando sua aplicabilidade e eficácia.

Avanços tecnológicos recentes também têm contribuído significativamente para aprimorar a biobalística. O uso de nanopartículas e a integração de ferramentas de edição genômica baseadas em CRISPR/Cas9 têm elevado os níveis de precisão, estabilidade e eficiência na introdução de características específicas (Prado et al., 2024; Sosa et al., 2025; Surya Krishna et al., 2023).

Paralelamente, a transformação mediada por *Agrobacterium* tem progredido e mostrado resultados promissores em determinadas variedades de cana-de-açúcar, com expressão estável dos transgenes ao longo de diversas gerações (Joyce et al., 2014). No

entanto, sua eficiência ainda é limitada em cultivares recalcitrantes, o que justifica a preferência pela biobalística em muitos contextos.

Diante desse cenário, a integração de múltiplas estratégias de transformação, associada ao desenvolvimento de protocolos mais otimizados e reprodutíveis, revela-se fundamental para maximizar os resultados da engenharia genética na cana-de-açúcar e ampliar o uso da biotecnologia no melhoramento dessa cultura.

No Brasil, o desenvolvimento e aplicação de organismos geneticamente modificados (OGMs) está sujeita à regulamentação da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), instituída pela Lei de Biossegurança (Lei nº 11.105/2005). Compete à CTNBio avaliar os riscos à saúde humana e ao meio ambiente relacionados aos OGMs, autorizando sua liberação comercial apenas quando considerados seguros.

2.4 O GENE *CP4-EPSPS* E A RESISTÊNCIA AO GLIFOSATO

O glifosato é um herbicida de largo espectro, amplamente utilizado nos sistemas agrícolas modernos devido à sua eficácia, custo acessível e versatilidade no manejo. Seu mecanismo de ação está associado à inibição da enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), essencial na via do ácido chiquímico, responsável pela biossíntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano em plantas, fungos e algumas bactérias (Duke, 2008).

A introdução do gene *cp4-epsps*, isolado da cepa CP4 da bactéria *A. tumefaciens*, tornou possível a obtenção de plantas geneticamente modificadas com resistência ao glifosato. Esse gene codifica uma variante da enzima EPSPS insensível à ação inibitória do herbicida, permitindo que a planta mantenha sua via metabólica mesmo sob aplicação do produto (Funke et al., 2006; Dill, 2005). Com isso, é possível eliminar plantas daninhas de forma eficaz, sem comprometer o desenvolvimento da cultura, reduzindo a competição por recursos essenciais como água, luz e nutrientes.

A resistência ao glifosato proporcionada por essa modificação genética tem sido explorada em diversas culturas agrícolas de grande relevância, como soja, milho, algodão e, mais recentemente, cana-de-açúcar. No caso desta última, o desenvolvimento de cultivares como a CTC Roundup Ready® viabilizou o cultivo em áreas submetidas à aplicação direta do herbicida, conferindo maior flexibilidade ao manejo, redução do uso de herbicidas seletivos e incremento na eficiência operacional.

Apesar das vantagens agronômicas evidentes, o uso contínuo e intensivo de variedades resistentes ao glifosato tem contribuído para a seleção de plantas daninhas também resistentes ao herbicida (Gaines et al., 2021). Esse fenômeno levanta preocupações quanto à sustentabilidade da tecnologia, exigindo a adoção de estratégias de manejo integrado.

Adicionalmente, o sucesso da resistência transgênica está condicionado à expressão eficiente do gene *cp4-epsps*, o que demanda o controle da expressão do gene pelo uso criterioso de promotores constitutivos ou tecido-específicos. A otimização da expressão gênica, especialmente em folhas e regiões meristemáticas, é fundamental para assegurar a eficácia do transgene sem prejudicar o crescimento e a produtividade das plantas.

Assim, embora a incorporação do gene *cp4-epsps* represente um avanço significativo na biotecnologia agrícola, seu uso deve ser pautado por práticas sustentáveis e integradas, que garantam tanto a eficácia do controle de plantas daninhas quanto a longevidade da tecnologia no ambiente produtivo.

2.5 CULTURA DE TECIDOS NA CANA-DE-AÇÚCAR: FUNDAMENTOS, APLICAÇÕES E DESAFIOS

O conceito de cultura de tecidos vegetais foi originalmente proposto por Gottlieb Haberlandt no início do século XX, estabelecendo as bases teóricas para essa importante tecnologia. Entre as décadas de 1940 e 1960, avanços experimentais consolidaram seu desenvolvimento e na década de 1990, a técnica foi amplamente incorporada à biotecnologia vegetal com a disseminação das práticas *in vitro* (Thorpe, 2007; Dagla, 2012). Fundamentada no princípio da totipotência celular, a capacidade de uma célula vegetal regenerar uma planta completa, a cultura de tecidos tornou-se um recurso indispensável para diversas aplicações em pesquisa e melhoramento vegetal.

O ambiente *in vitro* possibilita o controle rigoroso de variáveis físico-químicas e da composição nutricional do meio de cultura, favorecendo processos como a multiplicação clonal, a produção de mudas isentas de patógenos e a conservação de germoplasma (Guerra & Nodari, 2006; Alves et al., 2008). Além disso, esse sistema fornece um ambiente estéril e eficiente para regeneração de tecidos transformados, sendo uma etapa crítica na engenharia genética vegetal (Budeguer et al., 2021).

Na cana-de-açúcar, os primeiros estudos com cultura de tecidos concentraram-se na investigação do metabolismo de compostos específicos. A partir dessas abordagens iniciais, pesquisadores avançaram para a regeneração de plantas a partir de calos, marco alcançado por volta de 1967. A partir daí, diversos explantes, incluindo ápices caulinares e inflorescências, passaram a ser avaliados quanto à sua capacidade de indução calogênica (Heinz, 1969).

Um desafio recorrente nos processos de regeneração via calogênese diz respeito às alterações morfológicas observadas nas plantas regeneradas, quando comparadas às matrizes originais. Essas variações, muitas vezes atribuídas à instabilidade cromossômica induzida pelo cultivo *in vitro*, são manifestações do fenômeno conhecido como variação somaclonal (Raza et al., 2012; Thorat, 2017). A eficiência da regeneração vegetal é influenciada por uma série de fatores, como o tempo de cultivo, a composição do meio e, principalmente, o genótipo da planta. Nesse sentido, testes de conceito são indispensáveis para adaptar protocolos a diferentes variedades (Lima et al., 2001).

Entre as abordagens mais eficientes para regeneração na cana-de-açúcar destaca-se a embriogênese somática, que permite a formação de embriões a partir de células somáticas indiferenciadas. Essa técnica tem se mostrado especialmente promissora em alguns genótipos. Por exemplo, cultivares como RB996961 apresentam taxas superiores a 80% de embriogênese somática quando cultivados em meio MS suplementado com 2,4-D (Almeida, 2015).

Apesar de seu potencial, a cultura de tecidos apresenta limitações importantes. A variação somaclonal, amplificada pelo uso prolongado de reguladores de crescimento, pode comprometer a estabilidade genética e fenotípica das plantas regeneradas (Lakshmanan et al., 2006; Wang & Wang, 2012). Outro obstáculo frequente é a contaminação endofítica, causada por microrganismos como *Herbaspirillum sp.*, *Pseudomonas sp.* e *Enterobacter sp.*, que podem interferir na qualidade dos calos e na eficiência do processo regenerativo (Martins, 2007).

Frente a esses desafios, recentes avanços têm contribuído para o aperfeiçoamento dos protocolos, especialmente em espécies de difícil manipulação, como a cana-de-açúcar. Estratégias baseadas na propagação vegetativa por meio de meristemas apicais e axilares têm se mostrado eficazes na obtenção de plantas geneticamente homogêneas e livres de patógenos, fortalecendo programas de melhoramento (Getnet, 2017; Sandhu et al., 2009; Kumar et al., 2017). Entre os métodos regenerativos, a embriogênese

somática tem se destacado por sua maior capacidade de multiplicação e compatibilidade com técnicas de transformação genética, sendo frequentemente preferida à organogênese em protocolos mais avançados (Handro & Floh, 1990; Barros, 1999).

2.6 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

A embriogênese somática representa uma abordagem avançada dentro da cultura de tecidos e tem sido amplamente utilizada na transformação genética da cana-de-açúcar. Essa técnica baseia-se na capacidade de células somáticas, como aquelas derivadas de folhas ou calos, desenvolverem-se em embriões e, posteriormente, em plantas completas, sob condições *in vitro* controladas. Devido à sua elevada eficiência regenerativa e à capacidade de gerar plantas geneticamente uniformes a partir de um único evento de transformação, configura-se como o método preferencial para a produção em larga escala de organismos transgênicos (Méndez-Hernández et al., 2019).

O processo ocorre sem fusão gamética, por meio da reprogramação de células somáticas ou haploides, induzidas a percorrer estágios embriogênicos por estímulos exógenos, especialmente reguladores de crescimento, que alteram a expressão gênica e promovem a desdiferenciação celular. Desde sua primeira descrição por Steward et al. (1958), a técnica tem sido amplamente explorada e refinada. A embriogênese somática compreende duas etapas principais: a fase de indução, desencadeada por condições hormonais e estresses fisiológicos controlados, e a fase de expressão embriogênica, na qual as células adquirem competência para a formação de embriões (Jiménez, 2005; Loyola-Vargas, 2016).

Apesar da consolidação da técnica no melhoramento genético, limitações persistem, como instabilidade na cromatina e ocorrência de mutações somáticas, resultando em variações somaclonais. Essas alterações, geralmente atribuídas ao estresse causado pelo ambiente *in vitro*, podem provocar anomalias fenotípicas e rearranjos genômicos (Miguel & Marum, 2011; Arantes & Azevedo, 1986). No entanto, os benefícios superam essas limitações: além de permitir alta taxa de multiplicação, a técnica apresenta custo relativamente baixo e ampla viabilidade para a introdução de genes de interesse (Joshi & Kumar, 2013).

A embriogênese somática pode ser classificada em direta e indireta. Na forma direta, os embriões são originados diretamente dos explantes, enquanto na forma indireta,

mais comum, são derivados de calos previamente induzidos (Horstman et al., 2017). Nesse contexto, a calogênese constitui uma etapa crítica tanto para a regeneração embriogênica quanto para aplicações como clonagem e transformação genética (Venturieri & Venturieri, 2004).

A eficiência do processo depende de múltiplos fatores, incluindo o genótipo da variedade, o tipo de explante utilizado, a composição do meio de cultura e as concentrações dos reguladores de crescimento. Assim, a padronização de protocolos requer ajustes específicos para cada cultivar (Lakshmanan et al., 2006).

Na transformação genética, a embriogênese somática oferece um sistema regenerativo altamente eficaz, seja por biobalística ou via *A. tumefaciens*. Esses métodos permitem a inserção de genes associados à resistência a herbicidas, tolerância a estresses bióticos e abióticos, além de ganhos em produtividade. As linhagens resultantes tendem a apresentar estabilidade genética e expressão eficiente dos transgenes (Budeguer et al., 2021), o que reforça a importância da técnica no desenvolvimento de cultivares mais resilientes e sustentáveis (Rashid & Lateef, 2016).

2.7 CALOGÊNESE

A calogênese, definida como o processo de formação de calos a partir de tecidos vegetais, constitui uma etapa fundamental na cultura de tecidos, especialmente no contexto da embriogênese somática. Na cana-de-açúcar, esse processo é comumente induzido a partir de segmentos foliares jovens cultivados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com reguladores de crescimento como o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e aditivos naturais como a água de coco (Silva, 2012).

Os calos embriogênicos apresentam características morfológicas e celulares específicas, tais como paredes celulares enriquecidas com calose, presença de nucléolos proeminentes e baixos níveis de heterocromatina. Esses parâmetros indicam a competência celular para a indução embrionária e são essenciais para o sucesso na regeneração de plantas (Ikeuchi et al., 2013). A seleção rigorosa desses calos é, portanto, determinante para a eficiência do processo regenerativo.

Entretanto, a exposição prolongada ao 2,4-D pode comprometer a viabilidade embriogênica dos calos, promovendo senescência celular e perda de plasticidade. Esse efeito deletério destaca a necessidade de otimizar o tempo de cultivo e ajustar a composição do

meio a fim de preservar a capacidade regenerativa dos tecidos (Méndez-Hernández et al., 2019).

A diferenciação gradual da estrutura celular do calo ao longo do cultivo favorece a organização interna e o surgimento de estruturas embrionárias, evidenciando o caráter dinâmico do tecido calogênico (Ikeuchi et al., 2013). Essa constatação reforça a importância de análises histológicas, citológicas e moleculares para a correta avaliação do potencial regenerativo dos calos.

Além disso, a calogênese é altamente dependente de condições experimentais específicas, sendo influenciada por fatores como o tipo de explante utilizado, a concentração de sacarose, que regula a osmolaridade do meio e, conseqüentemente, a viabilidade celular, a presença de carvão ativado, que pode melhorar a qualidade morfológica dos calos, e, de forma decisiva, a correta dosagem de reguladores de crescimento (Silva, 2012; Jesus et al., 2011).

Assim, a calogênese configura-se não apenas como uma etapa preliminar à regeneração, mas como um processo central para o sucesso de estratégias de clonagem, micropropagação e transformação genética da cana-de-açúcar. Sua condução requer protocolos otimizados e ajustados ao genótipo em estudo, garantindo a obtenção de plantas regeneradas saudáveis, com uniformidade genética e estabilidade fenotípica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As atividades experimentais relacionadas ao cultivo *in vitro* e à transformação genética foram conduzidas no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (labCulTive), localizado no Centro de Excelência em Melhoramento Genético de Cana-de-açúcar, vinculado à Escola de Agronomia (EA) da Universidade Federal de Goiás (UFG). As análises de biologia molecular foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia de Fungos, localizado no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da mesma instituição.

3.1 CALOGÊNESE: PROTOCOLO INICIAL

A etapa inicial da implementação do protocolo de embriogênese somática indireta, específica para a cultivar de cana-de-açúcar RB034045, consistiu na indução de calos (calogênese). Foi utilizado material vegetal de cana-de-açúcar coletado diretamente em campo, proveniente do painel experimental do Agro Centro-Oeste, vinculado à Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás (EA/UFG). As amostras foram gentilmente fornecidas pelo Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar (PMGCA/UFG/RIDESA). A calogênese, enquanto etapa central do processo, compreende três fases principais: a seleção e preparo do explante vegetal, os procedimentos de descontaminação e a exposição ao meio de cultura apropriado para indução de calos. Esta fase inicial teve como objetivo estabelecer as condições iniciais para a formação de calos embriogênicos, que serviram de base para ajustes e otimizações do protocolo nas etapas subsequentes.

Com o intuito de avaliar a estabilidade do sistema e garantir a reprodutibilidade dos resultados obtidos, o ensaio inicial de calogênese foi conduzido em duas repetições independentes, sob as mesmas condições experimentais. Essa abordagem permitiu verificar a consistência da resposta morfogênica da variedade RB034045 ao protocolo inicial, fortalecendo a robustez metodológica das etapas que se seguiram.

3.1.1 Explante

O processo teve início com a coleta das porções apicais das plantas de cana-de-açúcar, conhecidas como “ponteiras”, que correspondem à extremidade superior da planta, composta por aproximadamente 30 cm do segmento final do ápice vegetal. Essas ponteiras foram selecionadas de plantas com idade entre 6 e 12 meses.

Em seguida, procedeu-se à remoção manual das folhas externas da porção apical da cana-de-açúcar até a obtenção de um segmento cilíndrico de aproximadamente 6 a 8 cm de comprimento, composto por folhas imaturas ainda envoltas e dispostas de forma concêntrica. Essa estrutura, localizada logo acima do nó +1 e internódio +1, conforme descrito no Sistema Kuijper (Scarpari; Beauclair, 2008), corresponde à região mais jovem do colmo, caracterizada por intensa atividade meristemática e elevado potencial morfogênico. Em estudos de cultura de tecidos, essa porção é frequentemente denominada “palmito apical”, embora também seja referida na literatura como “talo superior imaturo vegetal”, ou “tolete apical”, na qual trata-se de uma estrutura altamente responsiva em protocolos de indução de calos e regeneração *in vitro*, amplamente utilizada em procedimentos de transformação genética devido à sua composição jovem e à presença de tecidos meristemáticos internos (Figura 1).

Os toletes cilíndricos imaturos obtidos foram cortados transversalmente, resultando em discos foliares com espessura média de aproximadamente 2 mm. Esses discos excisados, portanto, representam o explante vegetal utilizado para indução da calogênese.

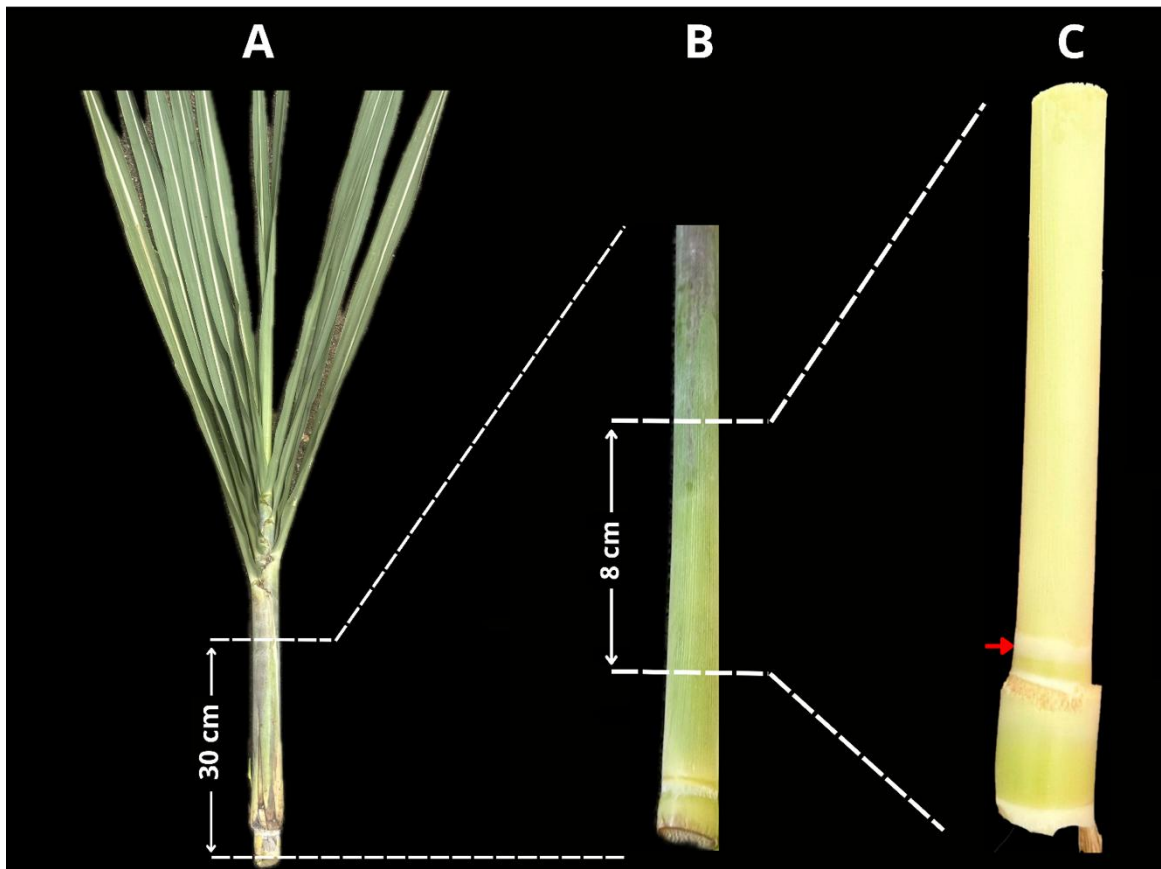


Figura 1. Preparo do explante vegetal. (A) Porção apical da cana-de-açúcar em campo experimental, composta pelos últimos 30 cm da extremidade superior do vegetal. (B) Observa-se um recorte desse mesmo segmento, na qual a barra destaca a região e o comprimento (8 cm) onde se encontra o tolete apical cilíndrico imaturo da cana-de-açúcar (talo/palmito vegetal) a ser excisado, ainda envolto pelas bainhas foliares mais externas. Por fim, à direita, (C) visualiza-se o mesmo tolete apical, com as folhas externas já totalmente removidas. Esse talo superior vegetal de folhas jovens sobrepostas pode ser localizado imediatamente acima da cicatriz da bainha (sinalizado pela seta vermelha), e é o material a ser descontaminado e segmentado transversalmente em discos foliares (explantes).

3.1.2 Descontaminação

A partir do material vegetal coletado em campo, foi realizado o processo de remoção das folhas externas da porção apical da planta, e subsequente imersão dos toletes cilíndricos apicais imaturos da cana-de-açúcar em água filtrada. Os materiais de coleta e preparo do segmento vegetal, como facas e bisturis, foram previamente higienizados com Herbalvet[®]. Subsequentemente, grupos compostos por 10 a 15 toletes apicais foram transferidos para frascos de vidro previamente autoclavados, contendo solução de etanol a

70% (v/v). Os materiais permaneceram imersos sob agitação por 1 minuto, em ambiente asséptico, já no interior da câmara de fluxo laminar. Em seguida, os explantes foram novamente imersos por mais 20 minutos em solução de hipoclorito de sódio à 1,25% (Qboa[®] comercial: 2,5% de cloro ativo diluída em água filtrada na proporção 1:1) + uma gota de Tween[®] 20 como agente tensoativo. Ao final, o material foi lavado três vezes com água filtrada e autoclavada para remover os resíduos do agente desinfetante.

3.1.3 Cultivo dos explantes e indução de calos

O cultivo *in vitro* dos explantes foi realizada imediatamente após a descontaminação, sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar. Os toletes cilíndricos apicais foram manipulados sobre papel filtro autoclavado, utilizado para remover o excesso de umidade. Com pinças e bisturis esterilizados, retiraram-se de duas a três folhas externas desse material, e discos foliares transversais de aproximadamente 3 mm foram seccionados e cultivados em frascos de vidro contendo meio para indução de calos. Cada frasco recebeu cinco discos, posicionados de forma a favorecer a indução calogênica.

Os frascos contendo os explantes foram mantidos em escuro contínuo, a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, com umidade relativa de 60%, por 30 dias, até o primeiro repique. Avaliações periódicas foram realizadas ao longo do cultivo para acompanhar o processo de formação dos calos e observar as características morfológicas associadas ao seu potencial embriogênico. Explantes contaminados ou oxidados foram descartados, e apenas materiais viáveis seguiram para as etapas seguintes.

3.1.4 Meio de cultura para indução de calos

O meio de cultura utilizado para indução de calos a partir dos discos consistiu em uma solução semissólida composta pelos sais do meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementada com $0,1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de inositol, $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose, $150\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido cítrico, $3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de azul de metileno, $1\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ de PPM[®] (*Plant Preservative Mixture*), $3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D) e $2,2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Gellan[®]. O PPM foi adicionado para controle microbiano, e o 2,4-D, como regulador de crescimento. O volume do meio variou conforme a demanda experimental, sendo 20 mL distribuídos por frasco de vidro de 150 ml de capacidade. A preparação foi realizada em Béquer de 4 L com água filtrada para

solubilização inicial, seguida da adição dos reagentes, exceto o agente gelificante, incorporado após dissolução completa dos demais componentes. O volume final foi ajustado com água filtrada, e o pH regulado entre 5,7 e 5,8. A solução permaneceu sob agitação constante com agitador magnético, e, após adição do Gellan[®], foi aquecida em micro-ondas até início de ebulição. Por fim, os frascos com o meio foram autoclavados a 120°C por 20 minutos, assegurando a esterilidade do cultivo *in vitro*.

3.1.5 Subcultivo dos calos

O repique, ou subcultivo das massas calosas, consistiu na transferência dos calos formados a partir dos explantes durante os primeiros 30 dias de cultivo para um novo meio de cultura fresco, com a mesma composição e preparo do meio original. A partir dessa fase, cada explante calogênico passou a ser cultivado individualmente em frascos separados. O procedimento foi realizado em fluxo laminar, com pinças e bisturis, fragmentando os calos em desenvolvimento e reposicionando-os sobre o meio de cultura renovado. Os frascos permaneceram nas mesmas condições ambientais por mais 30 dias, até a formação de calos embriogênicos.

Durante o período de cultivo, foram monitoradas as taxas de contaminação, a ocorrência de calogênese e a formação de calos com características embriogênicas. As respostas morfogenéticas foram inicialmente avaliadas de forma qualitativa, por meio do registro da presença ou ausência de massas calosas variadas em cada disco foliar. Nos casos em que foram identificados calos com aspecto embriogênico, procedeu-se também à avaliação quantitativa, baseada na contagem de unidades de calo embriogênico. Para fins de padronização e quantificação, considerou-se como unidade de calo embriogênico qualquer fragmento da massa calosa embriogênica com aproximadamente 4 mm de diâmetro.

3.2 CALOGÊNESE: ENSAIOS DE OTIMIZAÇÃO

3.2.1 Explante: Influência das regiões do tolete cilíndrico apical na morfogênese *in vitro*

Com base nos resultados do protocolo inicial de calogênese, foi conduzido um novo ensaio complementar com o objetivo de otimizar o protocolo. Mantendo-se as mesmas condições metodológicas adotadas anteriormente, buscou-se avaliar a influência da posição

de origem dos discos foliares (explantes) ao longo do material vegetal na resposta morfogênética. Para isso, os toletes apicais foram segmentados em três porções longitudinais: basal, medial e distal.

A delimitação dessas regiões considerou a proximidade em relação ao meristema apical. A região denominada basal correspondeu aos cinco primeiros discos foliares situados logo acima da cicatriz da bainha, região mais próxima ao meristema apical. A região medial foi composta pelos cinco discos intermediários, posicionados entre as porções basal e distal, e a região distal incluiu os cinco discos mais distantes do meristema, localizados na extremidade superior do cilindro vegetal (Figura 2).

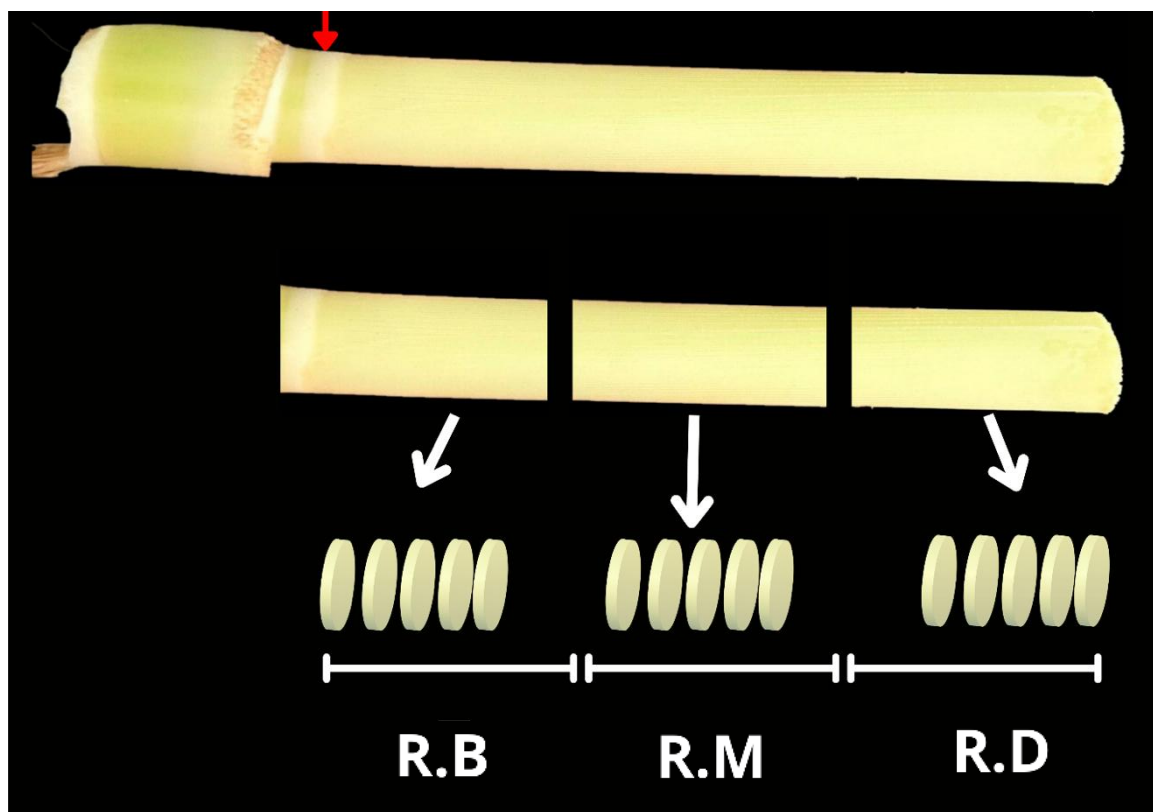


Figura 2. Delimitação das regiões basal, medial e distal em toletes apicais para extração de explantes. Representação esquemática do material vegetal utilizado como fonte de explantes. O Tolete/talo superior vegetal, de morfologia cilíndrica, localizado imediatamente acima da cicatriz da bainha (indicada pela seta vermelha), foi segmentado transversalmente e subdividido em três regiões: basal (R.B), medial (R.M) e distal (R.D). Foram retirados cinco discos foliares de cada região do talo, com espessura aproximada de 2 a 3 mm, os quais foram utilizados nos experimentos de calogênese.

Os conjuntos de discos foliares provenientes de cada uma dessas três regiões foram considerados individualmente como tratamentos experimentais distintos. Todos os demais procedimentos experimentais, incluindo as condições de cultivo *in vitro*, foram mantidos constantes, diferenciando-se apenas pela análise separada das respostas obtidas para cada região.

3.2.2 Descontaminação: Otimizações do protocolo para redução da contaminação *in vitro*

Com o objetivo de reduzir as taxas de contaminação, foram realizados três diferentes ensaios com modificações no protocolo de descontaminação dos toletes cilíndricos apicais. No primeiro ensaio, a estratégia foi aumentar a concentração do hipoclorito de sódio para 2,5% de cloro ativo.

No segundo ensaio, a concentração de hipoclorito de sódio foi mantida em 2,5%. Além disso, foi testada uma estratégia de dupla desinfecção, buscando reforçar a eliminação de contaminantes. Após a primeira etapa de descontaminação dos cilindros vegetais inteiros, os discos foliares já segmentados passaram por uma nova limpeza: primeiro uma imersão rápida em álcool 70% (1 minuto) e, em seguida, uma nova exposição ao hipoclorito 2,5% (2 minutos).

No último ensaio, manteve-se o uso de hipoclorito de sódio a 2,5%, conforme as etapas anteriores, diferenciando-se apenas pela redução da quantidade de toletes cilíndricos apicais por frasco a ser descontaminado, limitando o processo de desinfecção a no máximo 3 unidades por recipiente, visando uma limpeza mais individualizada e eficiente.

3.3 REGENERAÇÃO DE PLANTAS

Após 60 dias de calogênese em condições de escuro, os calos embriogênicos provenientes de cada disco foliar, foram cuidadosamente selecionados a partir da massa calosa total, sendo isolados apenas aqueles que apresentavam características visuais indicativas de potencial regenerativo, como coloração amarelada, textura compacta e aspecto nodular. A separação foi realizada em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar, com o auxílio de pinça e bisturi previamente autoclavados, sobre papel filtro estéril.

Faz-se importante reforçar que, para a padronização e quantificação das massas embriogênicas selecionadas, adotou-se como critério a definição de uma "unidade de calo embriogênico", correspondente a uma estrutura nodular embriogênica individualizada, com comprimento entre 3 e 5 mm. Após a separação manual das regiões embriogênicas das massas calosas formadas sobre os discos foliares, as unidades de calos embriogênicos foram transferidas, em condições assépticas, para frascos com meio regenerativo, etapa seguinte do protocolo.

Os frascos foram mantidos por mais 60 dias em sala de crescimento, a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 16 h luz/8 h escuro, umidade de 60% e irradiância de $45\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas Philips LED Green Power[®]. Um repique foi realizado no 30º dia e, ao longo do período, monitorou-se a regeneração e o estabelecimento das plântulas.

3.3.1 Meio de cultura para regeneração de plantas

Para a regeneração de plântulas a partir das unidades de calos embriogênicos, utilizou-se um meio de cultura específico, isento de reguladores de crescimento, contendo sais do meio MS, $0,1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de inositol, $150\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido cítrico, $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose, $1\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ de PPM e $2,2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Gellan[®] como agente gelificante. Próximo ao 60º dia de indução de calos, foram preparados os frascos com esse meio regenerativo, seguindo o mesmo protocolo de preparo e esterilização previamente estabelecidos, com autoclavagem a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 minutos. Cada frasco foi padronizado com 30 mL de meio e recebeu 10 unidades de calo embriogênico.

3.4 REGENERAÇÃO DE PLANTAS: ENSAIO DE OTIMIZAÇÃO

3.4.1 Meio de cultura para regeneração plantas: Efeito da suplementação na eficiência regenerativa

Com base no meio de regeneração básico previamente descrito, convencionalmente utilizado para cultivo in vitro de cana-de-açúcar, foram conduzidos ensaios com diferentes suplementações, com o objetivo de avaliar seus efeitos na elevação da taxa de regeneração de plântulas a partir de calos embriogênicos.

Portanto, o meio convencional foi complementado, em tratamentos distintos, com $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de 6-benzilaminopurina (BAP), $50 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ de água de coco ou $0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de caseína hidrolisada. Para cada tratamento, prepararam-se 10 frascos com 30 mL de meio, totalizando cerca de 300 mL por condição experimental. O preparo e a esterilização seguiram os protocolos previamente estabelecidos.

3.4.2 Concentração inibitória mínima de canamicina na regeneração de plantas

O vetor utilizado na transformação genética por biobalística tem o gene *nptII* como marcador, a expressão deste gene confere resistência ao antibiótico canamicina. Para definir a concentração do antibiótico que foi adicionado no meio de regeneração foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) de canamicina capaz de inviabilizar a regeneração dos calos de cana. A curva de inibição do crescimento de plântulas foi realizada em seis concentrações do antibiótico: 0, 12,5, 25, 50, 75 e $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. O experimento consistiu em cinco frascos por tratamento, totalizando 50 unidades de calos embriogênicos por concentração.

Os calos embriogênicos previamente selecionados e individualizados foram transferidos, sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar, para o meio de regeneração convencional, suplementado com as respectivas concentrações de canamicina, onde permaneceram por 45 dias, com repicagem realizada no 21º dia de cultivo. Durante esse período, os frascos foram mantidos em sala de crescimento sob temperatura controlada de $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz/8 horas de escuro, conforme as condições experimentais previamente estabelecidas.

Ao longo do desenvolvimento, foram realizadas avaliações periódicas quanto à viabilidade e à capacidade de regeneração dos calos, expressa pela taxa de brotação. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração de canamicina capaz de inibir completamente a regeneração de plântulas.

3.5 DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS EM MEIO LÍQUIDO

Após 60 dias de cultivo sob fotoperíodo controlado, as plântulas regeneradas a partir das unidades de calos embriogênicos foram avaliadas quanto ao seu desenvolvimento.

As que apresentaram morfologia adequada foram então transferidas para a etapa seguinte, correspondente ao alongamento e à micropropagação.

Nesta fase, as plântulas foram cultivadas em frascos de vidro contendo 20 mL de meio de cultura líquido, formulado especificamente para estimular o crescimento da parte aérea e o desenvolvimento radicular. Ao contrário dos meios semissólidos utilizados nas etapas anteriores, este foi preparado na forma líquida, contendo sais do meio MS completo, suplementado com $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de inositol, $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose, $125 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido cítrico, $0,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 6-benzilaminopurina (BAP) e $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de cinetina (KIN). O pH da solução foi ajustado para 5,8 antes da esterilização, realizada em autoclave a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ e 1 atm por 20 minutos. Os frascos contendo as plântulas foram mantidos em sala de crescimento, sob as mesmas condições ambientais previamente estabelecidas. Foram realizados repiques a cada 30 dias, permitindo a manutenção e multiplicação dos explantes.

3.6 BIOBALÍSTICA

A tentativa de obtenção da cana-de-açúcar transgênica ocorreu por meio da introdução do gene *cp4-epsps*, responsável por conferir resistência ao herbicida glifosato, utilizando a técnica de biobalística com acelerador de partículas a hélio sob alta pressão. Esse método permite a introdução direta de DNA exógeno em células vegetais por meio da propulsão de micropartículas revestidas com material genético. A etapa inicial envolveu a construção do vetor pRidesa/RR, contendo os genes *cp4-epsps* e *nptII*, este último utilizado como marcador seletivo em meio com canamicina. O vetor foi amplificado em *Escherichia coli* DH5- α e purificado para uso na transformação.

3.6.1 Precipitação do DNA nas micropartículas

Foi realizado a precipitação do DNA de interesse sobre micropartículas de tungstênio M10, conforme metodologia adaptada de Rech e Aragão (1998). As micropartículas foram preparadas em tubos estéreis com etanol 70%, submetidas a centrifugação e lavagens sucessivas, e ressuspensas em glicerol 50% estéril. Em seguida, 50 μL dessa suspensão foram misturados a 5 μL de DNA plasmidial contendo os genes *cp4-epsps* e *nptII*, seguidos da adição sequencial de 50 μL de CaCl_2 2,5 M e 20 μL de espermidina 0,1 M. A mistura foi incubada sob agitação lenta por 10 minutos e lavada com etanol

absoluto. A suspensão final foi distribuída, sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar, sobre membranas carreadoras e armazenada em dessecador com sílica gel até o momento do bombardeamento.

3.6.2 Preparo dos calos

O processo de transformação genética via biobalística envolveu o uso de três meios de cultura: osmótico, pós-bombardeamento e regenerativo. O meio osmótico foi formulado com MS básico, 2,4-D ($3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), BAP ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), caseína hidrolisada ($0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), PPM ($1 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$), Gellan[®] ($2,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e sacarose ($120 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) como agente osmótico. Esse meio foi distribuído em placas de Petri estéreis ($60 \times 15 \text{ mm}$), com 10 mL por unidade, onde as unidades de calos embriogênicos ($\sim 4 \text{ mm}$) foram transferidas e mantidos por quatro horas antes do bombardeamento. Para maximizar a eficiência do bombardeamento e minimizar os efeitos letais na região de impacto, as unidades de calo embriogênico foram cuidadosamente posicionadas nas placas de Petri, com ajuda das pinças, formando um anel periférico ao redor do centro da placa, evitando a chamada "zona de morte", área central com maior intensidade de partículas após a biobalística.

3.6.3 Bombardeamento Gênico

O bombardeamento foi realizado em câmara de vácuo sob pressão de 27 polegadas de Hg e hélio a 1200 psi, com a membrana carreadora posicionada a 8 mm da câmara de gás, 13 mm da tela de retenção e 80 mm do material vegetal. Antes do procedimento, o ambiente e os equipamentos foram higienizados com álcool 70% e radiação UV, e a umidade da sala foi controlada entre 20% e 30% com auxílio de desumidificador. As membranas, posicionadas sobre suportes, foram inseridas na câmara juntamente com placas de Petri contendo 10 unidades de calos cada, dispostos em meio osmótico. Após estabilização da pressão, a válvula solenoide foi ativada, promovendo a penetração das micropartículas de tungstênio recobertas com DNA nas células-alvo. Em seguida, os calos foram transferidos para o meio de pós-bombardeamento e, posteriormente, para o meio de regeneração, onde permaneceram sob análise por 45 dias, com repique no 20º dia, até a identificação de possíveis plântulas transgênicas regeneradas.

3.6.4 Repique dos calos após bombardeamento

Após a transformação, os calos permaneceram por 24 horas em meio de pós-bombardeamento, com composição idêntica à anterior, exceto pela redução da sacarose para $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Em seguida, foram transferidos para meio de regeneração, isento de reguladores de crescimento, contendo MS básico, sacarose ($20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), ácido cítrico ($150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), PPM ($1 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$), Gellan® ($2,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e canamicina como agente seletivo, cuja concentração adequada foi determinada em curva de inibição. Os meios foram distribuídos em frascos de vidro esterilizados, com volume padrão de 20 mL por frasco.

Foram realizados ensaios de viabilidade e testes controle (positivo e negativo) para validar a eficiência do protocolo de transformação genética. Os meios de cultura foram preparados de forma específica para cada condição experimental. O meio regenerativo utilizado nos testes de viabilidade e no controle positivo foi formulado sem adição de canamicina, enquanto o meio do controle negativo continha o antibiótico. Cada condição experimental foi composta por cinco frascos, contendo 10 calos embriogênicos não transformados por frasco, totalizando 50 calos por grupo.

3.6.5 Análise da integração dos genes *cp4-epsps* e *nptII* no genoma da cana-de-açúcar via PCR.

Folhas jovens foram coletadas em fluxo laminar com pinça e bisturi, maceradas em nitrogênio líquido e ressuspensas em tampão CTAB aquecido a $65 \text{ }^\circ\text{C}$ com β -mercaptoetanol. Após incubação por 1 hora, com agitação a cada 10 minutos, o material foi submetido à extração com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e centrifugação a 10.000 g por 10 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. A fase aquosa foi recuperada, e extraída novamente com clorofórmio, tratada com RNase A ($100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min e o DNA precipitado com etanol absoluto gelado, centrifugado (10.000 g , 20 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$), lavado com etanol 70% e seco sob fluxo laminar. O DNA foi ressuspensão em água filtrada e armazenado a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

A qualidade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1% e a concentração determinada por espectrofotometria (260/280 nm). O DNA obtido foi utilizado como molde em reações de PCR com os primers específicos para o gene *cp4-epsps* e *npt-II* para confirmação da integração desses genes no genoma da cana-de-açúcar.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PROTOCOLO INICIAL DE CALOGÊNESE

A etapa de calogênese representa um dos pilares dos protocolos de regeneração por embriogênese somática, sendo particularmente sensível à variação entre genótipos. Diferentes variedades de *Saccharum spp.* apresentam ampla variabilidade em sua resposta à indução de calos e ao subsequente desenvolvimento embriogênico, sendo comum a ocorrência de linhagens recalcitrantes, com baixa taxa de calogênese ou regeneração deficiente, o que inviabiliza sua utilização em procedimentos de transformação (Lakshmanan et al., 2005).

A resposta morfogênica da variedade RB034045 foi avaliada com foco na formação de calos embriogênicos viáveis e em quantidade adequada para aplicações biotecnológicas. Para isso, foram conduzidas duas repetições independentes do teste de calogênese (ver Material e Métodos, item 3.1), sob condições controladas e padronizadas, com o objetivo de verificar a consistência dos resultados e a reprodutibilidade do protocolo estabelecido.

Essa estratégia experimental possibilitou uma análise comparativa dos principais parâmetros envolvidos no processo, incluindo perda de explantes por contaminação, taxa de calogênese, ocorrência de embriogênese e rendimento embriogênico (Tabela 1). Os dados obtidos forneceram uma base técnica sólida para eventuais ajustes no protocolo, assegurando a robustez metodológica necessária à sua aplicação nas etapas subsequentes do estudo.

Tabela 1. Resumo dos resultados do protocolo inicial de calogênese em discos foliares da variedade RB034045 de cana-de-açúcar.

Análises	Valor Absoluto	
	Teste 1	Teste 2
Calogênese: Testes iniciais		
Total de discos foliares cultivados	450	1.140
Análise da taxa de contaminação		
Discos foliares contaminados (% Contaminação) ¹	349	870
Discos foliares assépticos / não contaminados	101	270
Análise dos discos assépticos		
Discos assépticos sem massa calosa	20	60
Discos assépticos com massa calosa (% Calogênese) ²	81	210
Análise dos discos com calogênese		
Disco com massa calosa embriogênica (% Embriogênese) ³	53	129
Massa de calos não embriogênicos	28	81
Total de unidades de calos embriogênicos	350	822
Rendimento ⁴	0,77	0,72

¹ Porcentagem calculada com base no total de discos foliares cultivados.

² Porcentagem calculada com base nos discos assépticos com e sem massa calosa.

³ Porcentagem calculada com base nos discos assépticos somente com massa calosa.

⁴ Rendimento calculado com base no total de unidades de calos embriogênicos sobre o total de discos foliares cultivados.

Ao longo das duas repetições conduzidas in vitro, foram cultivados ao todo 1.590 discos foliares com o objetivo de induzir a formação embriogênica. O Teste 1 compreendeu 450 discos, enquanto o Teste 2 englobou 1.140. Ambos os ensaios revelaram uma elevada taxa de contaminação microbiana, fator limitante que impactou negativamente o desempenho geral da cultura in vitro.

No Teste 1, dos 450 discos foliares inicialmente cultivados, 349 apresentaram contaminação visível e foram descartados. Dos 101 discos assépticos remanescentes, 81 formaram massas calosas, sendo que 53 exibiram características morfológicas compatíveis

com calos de natureza embriogênica, enquanto os 28 restantes originaram calos não embriogênicos. A partir desses calos embriogênicos, foram isoladas 350 unidades de calos com potencial regenerativo, resultando em um rendimento médio de 0,77 unidades de calos por disco foliar cultivado.

No Teste 2, a taxa de contaminação foi igualmente expressiva: dos 1.140 discos cultivados, 870 foram perdidos por contaminação. Dos 270 explantes que permaneceram assépticos, 210 formaram massas calosas. Dentre estas, 129 apresentaram características embriogênicas, e as demais 81 massas foram classificadas como não embriogênicas. Esse conjunto de calos embriogênicos originou 822 unidades isoladas, o que correspondeu ao um rendimento médio de 0,72 unidades de calos por disco foliar cultivado.

Os dados obtidos nos dois experimentos evidenciam que, apesar das perdas substanciais causadas pela contaminação microbiana, ambos os testes demonstraram um potencial embriogênico relevante da variedade RB034045, com valores consistentes de rendimento (0,77 no Teste 1 e 0,72 no Teste 2). Essa similaridade sugere que o comportamento embriogênico da cultivar é estável.

Em ambos os experimentos conduzidos, foram registradas elevadas taxas de contaminação nos discos foliares, com perdas de 77,6% no Teste 1 e 76,3% no Teste 2. Considerando apenas os explantes que permaneceram assépticos, observou-se formação de calos em 80,2% dos casos no Teste 1 e em 77,8% no Teste 2, indicando uma frequência expressiva de resposta morfogênica inicial da cultivar RB034045.

Dentre os calos formados, uma parcela considerável apresentou características morfológicas compatíveis com calos embriogênicos, o que correspondeu a 65,4% no Teste 1 e 61,4% no Teste 2. Os dados obtidos permitem uma análise de comparação percentual entre os dois ensaios (Figura 3).

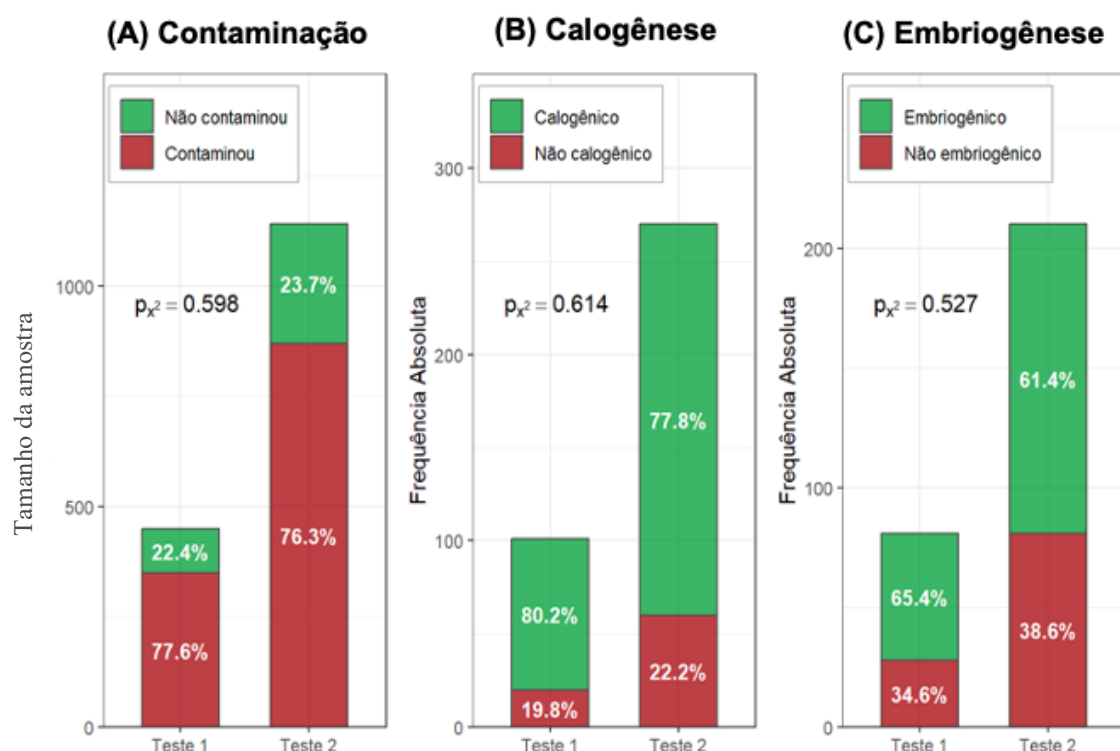


Figura 3. Frequência relativa de contaminação, calogênese e embriongênese somática da variedade de cana-de-açúcar RB034045 em duas repetições independentes. **(A)** Proporção de discos contaminados durante os 60 dias de cultivo para indução de calos. Apenas os discos assépticos foram mantidos e avaliados nos parâmetros seguintes, destacando-se o desafio de reduzir perdas por contaminação. **(B)** Frequência de massas calosas desenvolvidas entre os discos assépticos. **(C)** Frequência de discos foliares que apresentaram especificamente massas calosas embriongênicas, com regiões nodulares de coloração branco-amarelada. As demais massas calosas formaram calos mucilaginosos ou indiferenciados, considerados não embriongênicos.

As estruturas consideradas embriongênicas foram identificadas com base em características morfológicas específicas, tais como coloração branco-amarelada, textura firme ao toque e superfície nodular ou granular, aspectos clássicos associados à competência embriongênica em gramíneas, conforme descrito por Lima et al. (2001), Basnayake et al. (2011) e Li et al., (2021). A presença recorrente dessas características reforça a identidade embriongênica das massas calosas e indica um potencial regenerativo consistente na cultivar estudada.

Além disso, foram frequentemente observadas áreas de coloração avermelhada nos calos, especialmente em regiões periféricas às massas embriongênicas. Essas tonalidades são atribuídas ao acúmulo de antocianinas e têm sido interpretadas como indicadoras da transição entre a fase calogênica e o início da organogênese ou embriongênese somática

(Kortstee et al., 2011; Termignoni, 2005). A ocorrência dessa coloração, embora não necessariamente negativa, pode refletir alterações fisiológicas importantes no tecido cultivado, sinalizando a proximidade da diferenciação celular.

A análise estatística das variáveis qualitativas foi realizada por meio do teste qui-quadrado de independência. Os resultados indicaram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os ensaios 1 e 2 quanto à frequência de contaminação ($p = 0,5985$), calogênese ($p = 0,6139$) e embriogênese ($p = 0,5271$). Esses dados demonstram que as respostas morfogênicas observadas foram consistentes entre as repetições, corroborando a estabilidade do protocolo quanto a esses parâmetros (Tabela 2).

Tabela 2. Frequência (%) das variáveis qualitativas entre os dois testes de calogênese.

Variável	Teste 1	Teste 2	p-valor (Qui-Quadrado)
Contaminação	77,6%	76,3%	0,5985
Calogênese	80,2%	77,8%	0,6139
Embriogênese	65,4%	34,6%	0,5271

Para a variável quantitativa do rendimento (calos embriogênicos por disco foliar), foi aplicado o teste t de *Student* para amostras independentes, com o objetivo de comparar as médias obtidas entre os dois experimentos realizados (Figura 4).

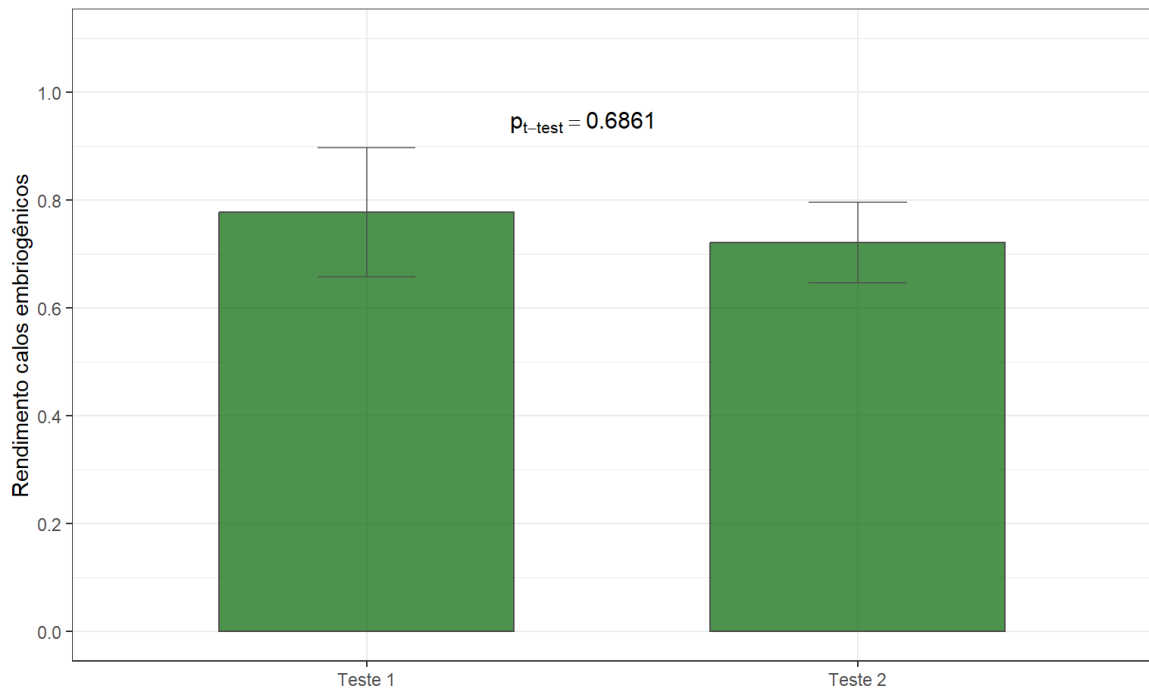


Figura 4. Rendimento médio de calos embriogênicos por disco foliar da cultivar de cana-de-açúcar RB034045 em dois ensaios independentes. As barras representam a média do número de unidades de calos embriogênicos obtida por disco cultivado, com linhas de erro indicando o intervalo de confiança de 95%. A análise estatística por teste *t* de Student não indicou diferença significativa entre os testes ($p = 0,6861$), evidenciando estabilidade do protocolo quanto ao rendimento embriogênico.

Os valores médios observados foram de 0,77 para o Teste 1 e 0,72 para o Teste 2, com desvios-padrão próximos, o que denota homogeneidade na dispersão dos dados. A análise estatística revelou ausência de diferença significativa entre os grupos ($t = 0,4042$; $p = 0,6861$), indicando que o protocolo apresentou comportamento estável quanto à eficiência de produção de calos embriogênicos por explante.

A análise de rendimento merece atenção especial do ponto de vista prático. Isso porque o rendimento representa um indicador integrado da eficiência global do protocolo, sendo razão entre a quantidade total de unidades de calos embriogênicos formadas ao final do processo e o número de discos foliares inicialmente cultivados. Dessa forma, esse parâmetro sintetiza, em um único valor, os impactos acumulados de diferentes etapas experimentais, como perdas por contaminação, ausência de calogênese ou formação de calos não embriogênicos, sobre o resultado final.

Portanto, o rendimento pode ser considerado o reflexo mais direto e objetivo do sucesso operacional do protocolo, especialmente quando se tem como finalidade a geração

de material embriogênico em quantidade suficiente para aplicação em processos subsequentes, como a transformação genética.

A utilidade prática do valor de rendimento se torna ainda mais evidente em contextos em que há uma demanda planejada de unidades de calos embriogênicos, por exemplo, para um experimento de biobalística. Nesse contexto, o rendimento funciona como uma estimativa prática da eficiência do processo, permitindo, a partir de seu valor, calcular quantos discos foliares devem ser cultivados para alcançar uma meta específica de produção de calos embriogênicos. Nesse ponto, destaca-se a importância da análise dos intervalos de confiança das médias de rendimento, que fornecem estimativas dos limites inferior e superior esperados para essa variável com 95% de confiança.

Para o Teste 1, o intervalo de confiança foi de 0,54 a 1,01, enquanto no Teste 2, variou de 0,57 a 0,86. Essa variação natural esperada dos dados assume um papel estratégico na gestão experimental, pois ao se basear no limite inferior do intervalo, que representa o pior cenário ainda dentro da margem de confiabilidade, é possível minimizar o risco de não se obter quantidade suficiente de calos embriogênicos para atender à demanda experimental ou produtiva. Em outras palavras, adotar o valor mínimo do intervalo como referência operacional permite garantir, com maior segurança, que a quantidade de explantes cultivados será suficiente para atender à demanda, mesmo diante de variações não controladas entre lotes ou repetições. Essa abordagem, embora conservadora, é altamente recomendável em sistemas sensíveis como a transformação genética, em que a disponibilidade limitada de calos embriogênicos pode comprometer o sucesso do experimento.

Considerando que todos os explantes cultivados neste experimento foram contabilizados no cálculo do rendimento, inclusive aqueles perdidos por contaminação, os valores obtidos (0,77 no Teste 1 e 0,72 no Teste 2) refletem a eficiência global do protocolo sob as condições específicas deste trabalho, marcadas por elevada taxa de contaminação. No entanto, reconhece-se que a aplicação desse indicador em estudos comparativos ou em contextos experimentais com menor incidência de contaminação pode resultar em interpretações enviesadas da eficiência do protocolo.

Assim, para fins comparativos ou aplicação em diferentes condições, sugere-se a utilização de uma métrica alternativa, calculada com base apenas nos discos foliares que permaneceram assépticos ao longo do experimento. Essa versão ajustada do rendimento permite uma estimativa mais precisa da eficiência do sistema sob condições ideais de assepsia. Considerando apenas os explantes assépticos, os rendimentos observados foram de

3,46 no Teste 1 (350/101) e 3,04 no Teste 2 (822/270), evidenciando o potencial do protocolo em condições livres de contaminação.

A condução do primeiro teste preliminar com a variedade RB034045 permitiu identificar pontos críticos e levantar demandas relevantes para o aperfeiçoamento do protocolo de embriogênese somática. Entre os fatores observados, destaca-se a necessidade de ajustes no protocolo de descontaminação dos tecidos vegetais para diminuir a perda de discos observada por contaminação. Outro fator importante a ser analisado é a determinação da região do tolete cilíndrico apical com maior rendimento para a produção de calos embriogênicos.

Diferentes porções do tolete cilíndrico apical podem apresentar concentrações distintas de microrganismos endofíticos, o que pode impactar as taxas de contaminação observadas *in vitro*. Além disso, o gradiente natural de hormônios endógenos, reservas metabólicas e potencial de reprogramação celular ao longo das lâminas foliares sobrepostas pode influenciar significativamente a competência morfogênica dos tecidos. Assim, a seleção estratégica de regiões com maior potencial embriogênico pode representar uma abordagem eficaz para aumentar a eficiência da calogênese e da regeneração em protocolos de cultura de tecidos vegetais.

Todos os explantes utilizados neste trabalho foram oriundos de campo, o que pode ter contribuído para a elevada taxa de contaminação observada. De modo geral, materiais vegetais coletados em ambiente natural estão mais sujeitos à presença de contaminantes externos e endofíticos, em razão da exposição a condições climáticas variáveis, como temperatura, umidade e precipitação, além do contato com microrganismos do solo, do ar e de insetos.

Essas características tornam o processo de assepsia mais complexo e, muitas vezes, menos eficaz, especialmente em protocolos de cultura de tecidos, nos quais a descontaminação eficiente é essencial para o sucesso da fase inicial de estabelecimento *in vitro*. Nesse contexto, a origem dos explantes representa um fator crítico que pode impactar diretamente os índices de contaminação em experimentos com material vegetal.

Paralelamente, o elevado índice de contaminação identificado reforça a importância de se aprimorar os protocolos de desinfestação. A presença de microrganismos contaminantes impacta diretamente a taxa de sucesso do cultivo, reduzindo o número de explantes viáveis disponíveis para as etapas subsequentes do processo. A redução dessas perdas não apenas eleva o aproveitamento do material vegetal, como também potencializa a

eficiência global do protocolo, especialmente quando se objetiva a transformação genética, onde a disponibilidade de calos embriogênicos é fator limitante.

Outra observação relevante surgiu a partir da utilização do azul de metileno como suplemento no meio de indução calogênica. O corante foi incorporado com o objetivo de reduzir a oxidação fenólica, um dos principais entraves ao cultivo *in vitro* de tecidos de cana-de-açúcar. Tradicionalmente empregado em análises microbiológicas e histológicas, o azul de metileno tem sido explorado em protocolos de cultura de tecidos vegetais devido ao seu potencial antioxidante e à possível influência sobre a morfogênese *in vitro*, atuando na estabilização do estado redox do meio de cultura, no controle da oxidação celular e na modulação de respostas morfogenéticas por meio de interações com mitocôndrias e outras organelas celulares (Salgueiro Lage & Esquibel, 1997; Aloni et al., 2010; Chen et al., 2019).

No decorrer do cultivo, observou-se um comportamento fenotípico distinto relacionado à presença do corante. Nos primeiros dias, os discos foliares e os calos em formação apresentaram coloração azulada, evidenciando a difusão do corante pelos tecidos. Após 60 dias de cultivo, foi constatado que calos não embriogênicos mantinham coloração verde-azulada, enquanto os calos com características embriogênicas típicas apresentavam coloração natural, sem vestígios do corante (Figura 5).

Essa diferenciação visual demonstrou potencial como marcador de embriogenicidade, possibilitando a identificação de calos competentes a regeneração. Considerando que a seleção de calos embriogênicos representa um dos principais desafios em protocolos de transformação via embriogênese somática, essa abordagem pode contribuir para tornar o processo mais eficiente, rápido e econômico.

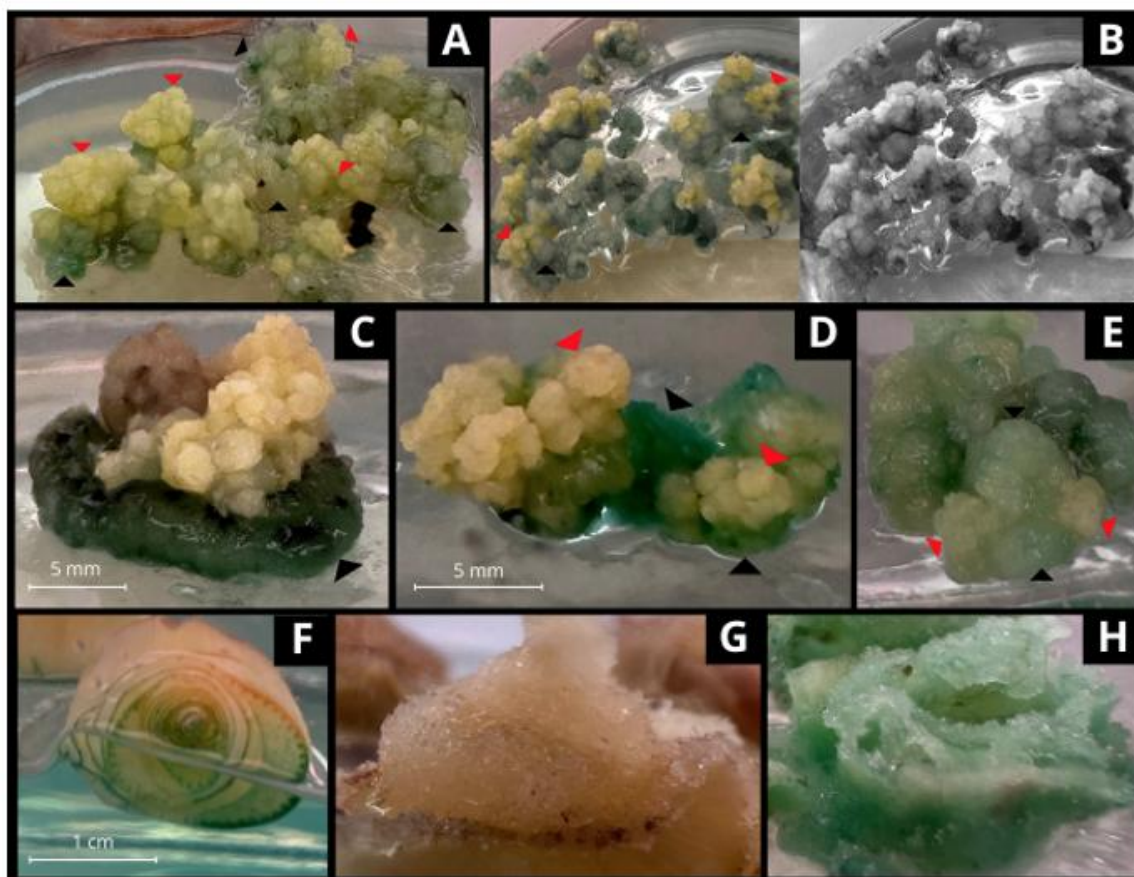


Figura 5. Efeito do azul de metileno na diferenciação visual de calos embriogênicos e não embriogênicos da variedade RB034045 de cana-de-açúcar. (A) Massa calosa após 60 dias de indução em meio suplementado com $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de azul de metileno. Setas vermelhas indicam calos embriogênicos (friáveis, amarelo-leitosos); setas pretas indicam calos não embriogênicos (mucilaginosos, verde-azulados). (B) Comparação entre a imagem original (esquerda) e versão com contraste e saturação ajustados (direita), ressaltando o padrão de coloração diferencial. (C–E) Detalhes morfológicos que evidenciam a distinção entre calos embriogênicos (amarelados, setas vermelhas) e não embriogênicos (azulados, setas pretas). (F) Disco foliar no 8º dia de cultivo, com intensa absorção do corante pela epiderme. (G, H) Comparação entre calos no 30º dia de indução: (G) massa calosa cultivada sem o corante (coloração castanho-amarelada); (H) calo cultivado com azul de metileno, apresentando coloração azul-esverdeada característica.

Até o presente momento, não foram encontrados relatos na literatura científica sobre o uso do azul de metileno como marcador visual de embriogenicidade em cana-de-açúcar ou em outras culturas vegetais, o que confere caráter inédito a essa proposta.

Como desdobramento futuro, propõe-se a condução de experimentos controlados para a validação dessa hipótese, incluindo a construção de uma curva de concentração do corante no meio de cultura, bem como a análise da resposta morfogênica associada a diferentes concentrações. Ensaios sistemáticos devem ser planejados com base

em parâmetros quantitativos e qualitativos de embriogênese e regeneração, com o objetivo de confirmar a precisão, a consistência dos resultados e o potencial de uso prático do azul de metileno como ferramenta auxiliar na triagem de protocolos de cultura de tecidos vegetais aplicados à transformação genética.

4.2 ENSAIOS DE OTIMIZAÇÃO DA CALOGÊNESE

4.2.1 Explante: influência das regiões do tolete cilíndrico apical na morfogênese in vitro

A resposta morfogênica de tecidos vegetais in vitro está diretamente relacionada à maturidade, ao estado fisiológico e à posição do explante (De Andrade, 2002). Com base nesse princípio, este estudo avaliou como a posição dos discos foliares influencia as respostas morfogênicas in vitro da cultivar RB034045 de cana-de-açúcar. Para isso, conduziu-se um experimento comparativo entre as regiões basal, medial e distal do tolete cilíndrico apical, com o objetivo de otimizar a seleção do material vegetal para a indução de calos embriogênicos (Material e Métodos - item 3.2.1). Com base nos resultados descritos na Tabela 3 foi possível identificar a contribuição proporcional de cada região do explante em relação às variáveis avaliadas, contaminação, calogênese, embriogênese e rendimento.

Tabela 3. Avaliação do desempenho morfogênico in vitro das diferentes regiões do tolete cilíndrico apical da cultivar RB034045 de cana-de-açúcar (basal, medial e distal). Os valores totais representam o somatório geral do ensaio, e os valores por região indicam sua participação relativa no resultado final.

Região	Basal	Medial	Distal	Total
Discos cultivados	380	380	380	1.140
Contaminados	248	313	309	870
Assépticos	132	67	71	270
Com massa calosa (Calogênese)	126	54	30	210
Sem massa calosa	6	13	41	60
Com massa calosa embriogênica (Embriogênese)	85	34	10	129
Unidades de calos embriogênicos	606	170	46	822
Rendimento médio (Unid. calo/disco cultivado)	1,59	0,44	0,12	0,72

A região basal apresentou os melhores resultados, com menor taxa de contaminação (248/380 discos) e alta taxa de calogênese: 126 dos 132 discos assépticos formaram calos, dos quais 85 mostraram características embriogênicas. Ao todo, os discos foliares dessa região originaram 606 unidades embriogênicas, representando um rendimento de aproximadamente 1,59 unidades embriogênicas por disco. Esse desempenho destaca a região basal como preferencial para protocolos de embriogênese somática e consequentemente para a transformação genética, especialmente pela eficiência morfogênica

A região medial teve desempenho intermediário. Dos 380 discos, 313 apresentaram contaminação. Entre os 67 assépticos, 54 formaram calos, sendo 34 embriogênicos. O rendimento foi de 170 unidades embriogênicas, com média de 0,44 por disco foliar. Apesar da contaminação elevada, os resultados morfogênicos foram satisfatórios, justificando o uso da região medial em situações de limitação de material.

A região distal apresentou os piores resultados. Dos 380 discos, 309 foram contaminados. Dos 71 discos assépticos, apenas 30 formaram calos, e só 10 apresentaram

embriogênese. O rendimento foi de 46 unidades, média de 0,12 por explante. A baixa performance é atribuída à maior diferenciação celular e menor atividade meristemática, comprometendo a reprogramação celular.

Como forma complementar de análise, foi elaborado um gráfico que simula o desempenho percentual do ensaio considerando o uso exclusivo de cada região do tolete apical. Essa abordagem permite visualizar, para cada variável analisada, quais seriam as taxas obtidas caso o experimento tivesse sido conduzido utilizando isoladamente apenas a região basal, medial ou distal (Figura 6).

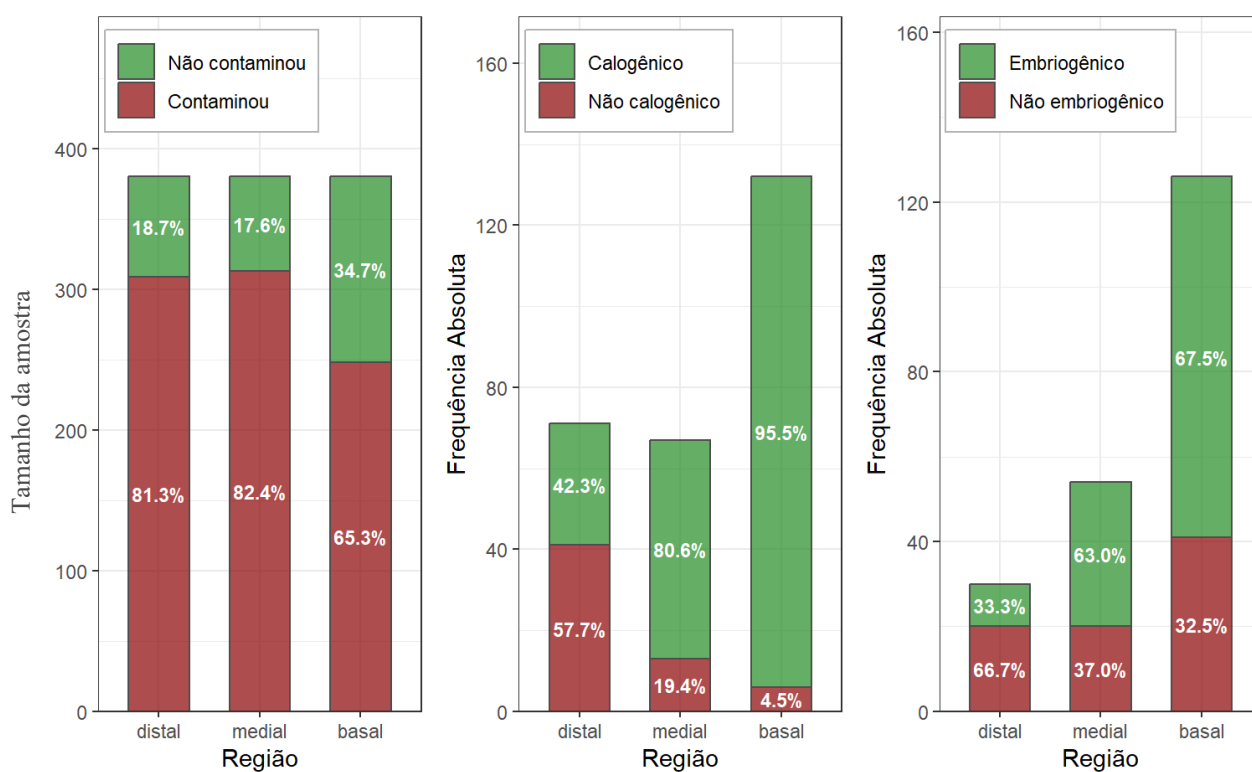


Figura 6. Gráficos de barras representando a análise individual dos discos foliares de cada região do tolete cilíndrico apical (distal, medial e basal) em relação a três parâmetros: contaminação, calogênese e embriogênese. A visualização permite, além da observação isolada de cada região, a comparação entre elas quanto ao desempenho em cada variável analisada, destacando diferenças na resposta morfológica dos explantes conforme a posição ao longo do eixo longitudinal do tolete apical.

Por meio das análises estatísticas, objetivou-se identificar qual das regiões vegetais apresenta melhor desempenho quanto aos parâmetros estudados. Para as variáveis categóricas, contaminação, calogênese e embriogênese, foram realizadas análises por regressão logística binária, com cálculo da *odds ratio* (OR), intervalos de confiança de 95% e respectivos p-valores (Tabela 4).

Tabela 4. Análise estatística por regressão logística para as variáveis contaminação, calogênese e embriogênese das regiões do tolete cilíndrico apical da cana-de-açúcar RB034045.

Comparação	Odds Ratio (OR)¹	IC 95%²	p-valor
Contaminação			
Medial vs. Basal	2,49***	1,66 – 3,72	<0,001
Distal vs. Basal	2,32***	1,55 – 3,45	<0,001
Distal vs. Medial	0,93	0,60 – 1,45	0,900
Calogênese			
Basal vs. Distal	28,70***	9,27 – 88,80	< 0,001
Basal vs. Medial	5,06**	1,50 – 17,10	0,005
Medial vs. Distal	5,68***	2,27 – 12,20	< 0,001
Embriogênese			
Basal vs. Distal	4,15**	1,51 – 11,40	0,003
Basal vs. Medial	1,21**	0,55 – 2,71	0,800
Medial vs. Distal	3,43*	1,11 – 10,40	0,029

¹: *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001

²: Inferior – Superior.

Abreviações: IC = Intervalo de Confiança, OR = *Odds Ratio* (Razão de chances).

A análise da variável contaminação revelou diferenças estatisticamente significativas entre as regiões. A região basal apresentou a menor taxa de contaminação (65,3%), enquanto as regiões medial e distal exibiram índices superiores (82,3% e 81,3%, respectivamente).

Pela regressão logística a probabilidade, em termos de *odds ratio*, a região medial tem 2,49 vezes (ou 149% a mais) mais chances de contaminar que a região basal (OR = 2,49; $p < 0,05$). A região distal possui 2,32 (ou 132% a mais) vezes mais chances de contaminar que a região basal, em termos de *odds ratio* (OR = 2,32; $p < 0,05$). Não houve diferença estatística entre medial e distal ($p = 0,9$).

Esses resultados reforçam que a contaminação não ocorre de maneira homogênea entre as porções do tolete cilíndrico apical, podendo estar relacionada a diferenças estruturais, como grau de vascularização e presença de câmaras intercelulares,

que favorecem a colonização por microrganismos endofíticos (Hu et al., 2017). Além disso, observou-se que a contaminação de um único disco frequentemente comprometia os demais do mesmo frasco, reforçando a necessidade de distribuir os explantes individualmente e revisar os protocolos de desinfestação.

Na calogênese, a superioridade da região basal foi marcante. Essa porção obteve uma taxa de indução de calos em 95,4% dos discos assépticos, enquanto a medial atingiu 80,6% e a distal apenas 42,3%.

Pela regressão logística a probabilidade, em termos de *odds ratio*, a região basal tem 28,7 vezes (ou 2770% a mais) mais chances de calogênese que explantes da região distal (OR = 28,7; $p < 0,001$). A região basal possui 5,06 (ou 406% a mais) vezes mais chances de calogênese que a região medial, em termos de *odds ratio* (OR = 5,06; $p = 0,005$). Contudo, a região medial também se destacou positivamente frente à distal (OR = 5,68; $p < 0,001$), demonstrando um desempenho intermediário.

Para a embriogênese somática, a tendência se manteve. A região basal apresentou taxa de 67,2% de formação de calos embriogênicos, contra 62,9% na medial e 33,3% na distal. A diferença entre a basal e a distal foi estatisticamente significativa (OR = 4,15; $p = 0,003$), enquanto não houve diferença significativa entre basal e medial ($p > 0,05$), indicando uma competência embriogênica similar entre essas duas regiões. A região medial também foi estatisticamente superior a distal (OR = 3,4; $p = 0,029$).

A superioridade da região basal pode estar associada à maior concentração de tecidos meristemáticos, atividade mitótica mais elevada e acúmulo de reservas celulares, fatores já relatados como determinantes para o sucesso na indução e manutenção de calos embriogênicos em gramíneas (Rao, 2015; Neves et al., 2003; Hu et al., 2017). Foi possível observar diferenças visuais entre os discos das diferentes regiões, corroborando os dados morfogênicos observados (Figura 7).

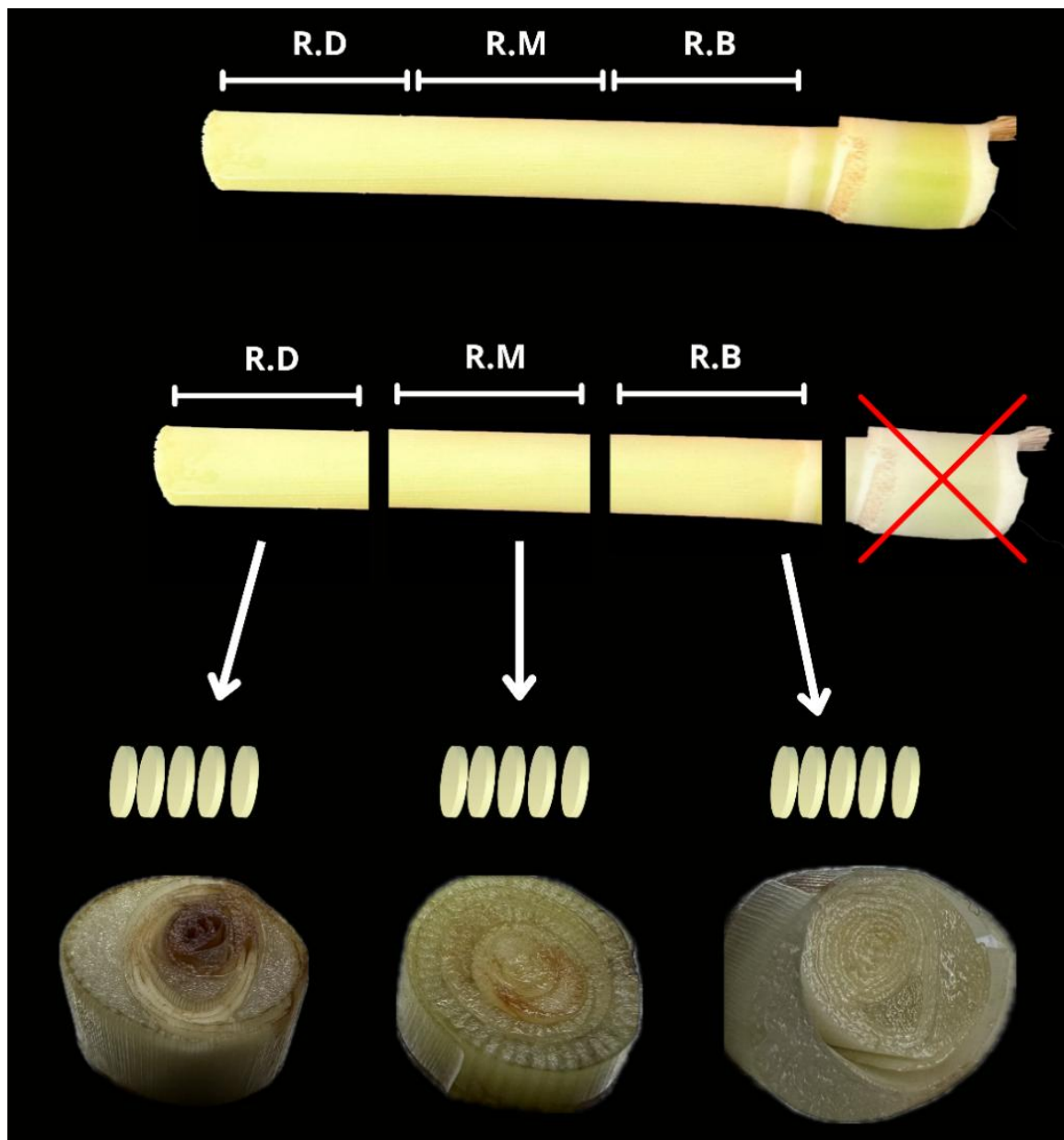


Figura 7. Representação esquemática da segmentação do tolete cilíndrico apical da variedade de cana-de-açúcar RB034045 para a obtenção dos discos foliares utilizados como explantes. O cilindro vegetal superior corresponde ao tolete apical previamente descontaminado, posteriormente dividido em três regiões longitudinais: basal (R.B), medial (R.M) e distal (R.D). De cada segmento foram seccionados transversalmente cinco discos foliares com 2 a 3 mm de espessura, totalizando 15 discos por tolete. Abaixo, são ilustradas as porções cortadas e os respectivos discos obtidos, com destaque para as características visuais predominantes: região basal com coloração clara e tecidos jovens; região medial com coloração levemente amarelada; e região distal com escurecimento progressivo e presença de manchas marrons. A extremidade basal do cilindro, onde se localiza o meristema é descartada e não utilizada nos experimentos.

Para a variável quantitativa contínua “rendimento”, foi aplicada uma análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey para comparação múltipla entre médias. Essas análises permitiram determinar não apenas a existência de diferenças estatísticas entre as regiões, mas também a magnitude da influência de cada uma sobre a eficiência embriogênica (Tabela 5).

Tabela 5. Análises estatísticas descritivas e análise de variância para o rendimento médio de calos embriogênicos por disco foliar, por região do tolete cilíndrico apical da cana-de-açúcar RB034045.

Região do tolete	Média	IC 95%¹	Grupo (Tukey)
Basal	1,59	1,23 – 1,96	A
Medial	0,44	0,24 – 0,65	B
Distal	0,12	0,035 – 0,20	B

¹: Inferior – Superior.

Abreviações: IC = Intervalo de Confiança.

O rendimento de unidades de calos embriogênicos por disco cultivado foi o parâmetro mais relevante do ponto de vista operacional. Este valor reflete de maneira integrada o sucesso do protocolo, pois abarca, em uma única métrica, todas as possíveis perdas, contaminação, ausência de calogênese ou calos não embriogênicos. A região basal apresentou rendimento médio de 1,59 (IC95%: 1,23–1,96), significativamente superior ao da região medial (0,44; IC95%: 0,24–0,65) e ao da distal (0,12; IC95%: 0,035–0,20) ($p < 0,001$). A diferença entre medial e distal não foi estatisticamente significativa.

Ou seja, o rendimento da região basal pelo teste de Tukey é maior que a região medial e distal. A expectativa (com intervalo de confiança de 95%) é que a cada disco foliar basal sejam gerados de 1,23 a 1,96 unidades embriogênicas. Esses valores para distal e medial são respectivamente: 0,03-0,20 e 0,24-0,65. Em outras palavras, a região basal pode gerar de a 1,89 a 8,16 mais rendimento que a região medial, por exemplo.

Com base nesses dados, a utilização de discos exclusivamente da região basal representaria a estratégia mais eficiente em termos de produtividade morfogênica (Figura 8).

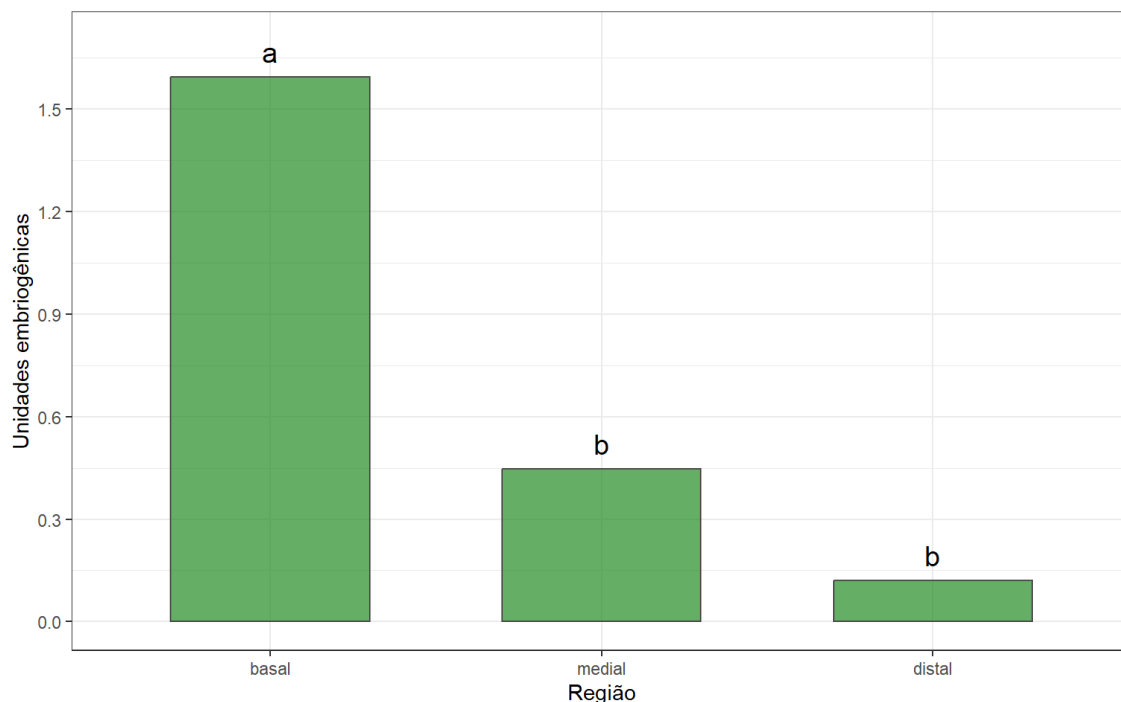


Figura 8. Número médio de unidades embriogênicas por disco foliar obtidas das regiões basal, medial e distal do tolete cilíndrico apical da cana-de-açúcar (cultivar RB034045). Verifica-se diferença estatística significativa entre a região basal e as demais, com maior rendimento embriogênico (letra ‘a’), enquanto as regiões medial e distal não diferiram entre si (letra ‘b’), conforme teste de Tukey ($p < 0,05$). Esses resultados indicam que a porção basal apresenta maior potencial embriogênico em comparação às porções mais distais.

Em cenários onde o material vegetal disponível é escasso, a inclusão da região medial pode ser considerada uma alternativa viável. Embora sua incorporação tenda a reduzir ligeiramente o rendimento geral, ela pode dobrar a capacidade de produção de discos por ponteira (de 5 para 10 discos por planta coletada), reduzindo a necessidade de coleta de grandes quantidades de biomassa. Por exemplo, para se obter 100 discos da região basal, seriam necessárias 20 ponteiras. No entanto, ao incluir a região medial, essa demanda cairia para 10 ponteiras. Em contextos com restrição de acesso a plantas matrizes ou em fases iniciais de experimentação, essa estratégia pode representar um custo-benefício operacional mais equilibrado, desde que se aceite uma leve redução na média de rendimento.

Além disso, deve-se considerar que regiões com menor taxa de contaminação, como a basal, resultam em menor descarte de frascos, menos ciclos de autoclavagem e menor

consumo de insumos e mão de obra, fatores que também impactam diretamente na viabilidade econômica do protocolo.

Portanto, conclui-se que a região basal deve ser prioritariamente utilizada em protocolos de indução de calos embriogênicos da variedade RB034045, especialmente em fases avançadas de experimentação ou quando se exige alta eficiência por unidade cultivada. No entanto, a região medial pode ser incorporada estrategicamente em condições específicas, desde que se avalie previamente o impacto sobre o rendimento final. A exclusão da região distal é recomendada, devido à sua baixa responsividade, elevada contaminação e risco de comprometer a eficiência geral do sistema.

Esses resultados reforçam a importância da seleção precisa do explante vegetal, não apenas por seu impacto biológico, mas também por sua relevância prática e econômica em contextos de cultivo *in vitro* voltados à transformação genética. Além disso, apontam para a necessidade de ajustes complementares nos protocolos de descontaminação e manejo de explantes, que possam reduzir a propagação cruzada de contaminações dentro dos frascos e garantir maior uniformidade no desempenho morfogênico.

4.2.2 Descontaminação: Otimizações do protocolo para redução da contaminação *in vitro*

Apesar da otimização criteriosa dos explantes das regiões basal e medial do tolete cilíndrico apical, observou-se uma persistente taxa de contaminação elevada, indicando que a seleção do material vegetal, por si só, não é suficiente para promover uma redução efetiva dessa adversidade. A recorrência de contaminações mesmo após procedimentos de limpeza rigorosos apontou para a presença de microrganismos endofíticos, habitantes internos dos tecidos vegetais, que permanecem latentes até o cultivo *in vitro*. Ao contrário dos contaminantes epifíticos, elimináveis por lavagens convencionais, os endofíticos exigem estratégias mais eficazes, dada sua localização em feixes vasculares e tecidos internos (Hallmann et al., 1997).

Com o intuito de estabelecer o protocolo de desinfestação mais eficiente para a cultivar RB034045, foram testados quatro tratamentos distintos envolvendo hipoclorito de sódio a diferentes concentrações (1,25% e 2,5%) e estratégias complementares, como a redução do número de tolete apical por frasco e a realização de uma segunda etapa de desinfecção (Material e Métodos - item 3.2.2). O objetivo foi verificar o impacto dessas

variações sobre os principais parâmetros morfogênicos: contaminação, calogênese, embriogênese somática e rendimento final de calos embriogênicos por disco foliar e, com base nisso, definir o protocolo mais eficaz para aplicação em processos regenerativos e transformações genéticas.

4.2.2.1 Uso de Hipoclorito de Sódio a 2,5%

A substituição do hipoclorito de sódio diluído por hipoclorito de sódio comercial (2,0–2,5% de cloro ativo) resultou em taxa de contaminação de 60,2% (301 de 500 discos). Dos 199 discos assépticos, 188 formaram calos, e 90 apresentaram calos embriogênicos. Ao todo foram obtidas 540 unidades embriogênicas, o que representa uma média de 1,08 unidades embriogênicas por disco foliar cultivado.

4.2.2.2 Protocolo de Dupla Desinfecção

A estratégia de dupla desinfecção (tolete cilíndrico apical + discos foliares) apresentou taxa de contaminação semelhante à anterior (65%), mas com queda expressiva na embriogênese. Dos 200 discos cultivados, 59 formaram calos (calogênese de 84,3%), mas apenas cinco geraram calos embriogênicos, desses foram individualizadas 23 unidades embriogênicas (média de 0,115 por disco). A intensa oxidação e escurecimento observados indicam que a exposição prolongada ao hipoclorito comprometeu a viabilidade dos tecidos (Figura 9).

A desinfecção simultânea de múltiplos discos em um único frasco pode ter favorecido a transferência cruzada de contaminantes. Apesar da leve redução na contaminação, a estratégia demonstrou baixo rendimento embriogênico e efeitos deletérios sobre a morfogênese, sendo considerada inadequada.

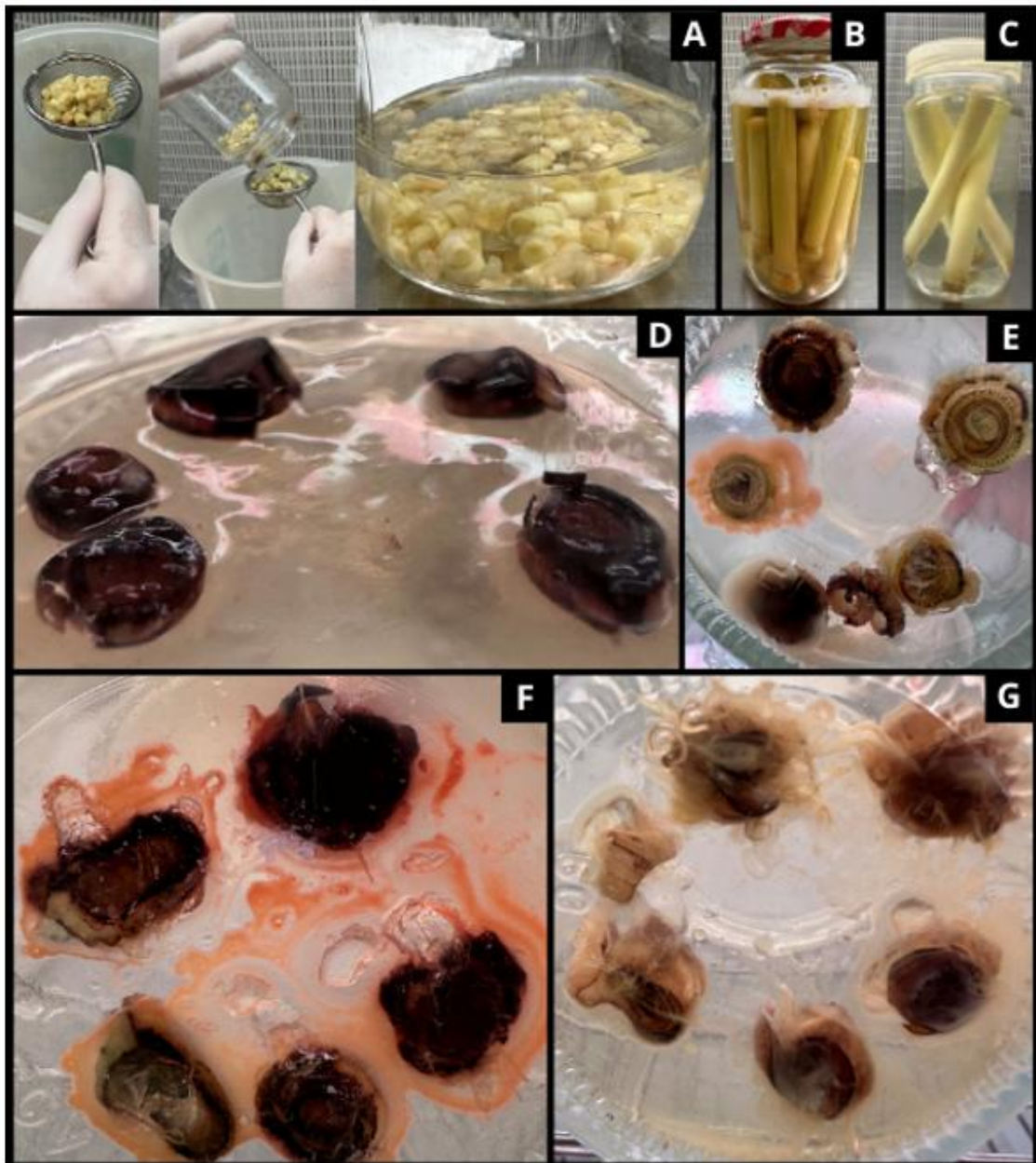


Figura 9. Estratégias de descontaminação e desafios associados à contaminação endofítica em cultivos *in vitro* de cana-de-açúcar RB034045. (A) Aplicação da técnica de dupla desinfecção nos discos foliares, utilizando peneira autoclavada para imersão sequencial em etanol e hipoclorito. (B–C) Diferença entre protocolos com alta (15 unidades) e baixa densidade (3 unidades) de toletes apicais por frasco durante a etapa de desinfecção: imersão em etanol 70% por 1 minuto, seguida de hipoclorito de sódio a 2,5% por 20 minutos. (D) Discos foliares com intensa oxidação e ausência de calos ao final de 30 dias, frequentemente observados após dupla desinfecção. (E–F) Colonização bacteriana em discos foliares durante a calogênese, principal barreira ao estabelecimento *in vitro*. A imagem (E) destaca o surgimento da contaminação a partir do explante, com difusão para o meio de cultura, sugerindo origem endofítica. A coloração rosá-leitosa é um possível indicativo da presença de bactérias. (G) Contaminação recorrente de coloração esbranquiçada, comumente observadas na fase inicial de cultivo.

4.2.2.3 Redução do Número de Explantes por Frasco

A modificação mais eficaz foi a redução do número de explantes por frasco de 10–15 para, no máximo, três unidades. A taxa de contaminação caiu para aproximadamente 20,4% (53 de 260 discos), sem comprometer a morfogênese. A maior eficácia do desinfetante se deve à melhor penetração e cobertura com menos biomassa, à menor probabilidade de incluir explantes altamente contaminados e à redução da contaminação cruzada.

Apesar de aumentar o número de frascos utilizados, essa abordagem se mostrou vantajosa por reduzir perdas e manter a eficiência do protocolo. Esta realidade permitiu alcançar o melhor rendimento médio de unidades de calos embriogênicos por disco cultivado (1,87) deste trabalho, uma vez que esse ensaio utilizou os explantes já otimizados, apenas regiões basal e medial, junto ao protocolo de maior sucesso.

As variáveis qualitativas (contaminação, calogênese e embriogênese) foram analisadas por regressão logística binária, utilizando como métrica a razão de chances (*odds ratio*) entre os tratamentos.

Inicialmente, os resultados revelaram diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos quanto à taxa de contaminação ($p < 0,05$). O protocolo composto por hipoclorito de sódio a 2,5% associado à redução do número de tolete apical por frasco apresentou o melhor desempenho (Tabela 6), com apenas 20,4% de discos contaminados.

Tabela 6. Comparação entre protocolos de desinfestação (regressão logística) para a variável contaminação.

Ajustes no Protocolo	OR ¹	95% IC ²	p-valor
(hipoclorito 2,5 + 2ª desinfec.) / (hipoclorito 2,5 + redução tolete apical)	7,25***	4,19-12,60	<0,001
hipoclorito 2,5 / (hipoclorito 2,5 + redução tolete apical)	5,91***	3,73-9,36	<0,001
hipoclorito 2,5 / (hipoclorito 2,5 + 2ª desinfecção)	0,81	0,52-1,27	0,600
hipoclorito 1,25 / (hipoclorito 2,5 + redução tolete apical)	11,0***	7,03-17,20	<0,001
hipoclorito 1,25 / (hipoclorito 2,5 + 2ª desinfecção)	1,52	0,98-2,35	0,066
hipoclorito 1,25 / hipoclorito 2,5	1,86***	1,36-2,56	<0,001

¹: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

²: Inferior – Superior.

Abreviações: IC = Intervalo de Confiança, OR = *Odds Ratio* (Razão de chances).

Em comparação a esse protocolo, o tratamento com hipoclorito a 2,5% seguido de uma segunda desinfecção apresentou uma chance de contaminação 2,49 vezes maior ($p = 0,037$). O protocolo com hipoclorito a 1,25% resultou em uma probabilidade 3,39 vezes maior de contaminação ($p = 0,010$), enquanto o protocolo com hipoclorito a 2,5% convencional elevou essa chance para 3,86 vezes ($p = 0,007$). Esses achados reforçam a eficácia da estratégia de redução do número de toletes apicais por frasco, possivelmente por diminuir a carga microbiana inicial e favorecer uma ação mais eficiente do agente desinfetante.

As taxas de calogênese foram elevadas em todos os protocolos, refletindo a boa competência morfogênica da cultivar RB034045. No entanto, foi observada uma diferença estatística marginal entre os tratamentos com hipoclorito a 2,5% + redução de tolete apical e hipoclorito a 2,5% + segunda desinfecção, com superioridade do primeiro ($p = 0,046$). As demais comparações entre os tratamentos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$), o que indica que a calogênese, embora elevada, não foi significativamente influenciada pelas variações testadas na desinfestação, exceto por essa leve vantagem do protocolo com redução de tolete apical (Tabela 7).

Tabela 7. Comparação entre protocolos de desinfestação (regressão logística) para a variável calogênese.

Ajustes no Protocolo	OR ¹	95% IC ²	p-valor
(hipoclorito 2,5+2ª desinfecção) / (hipoclorito 2,5+redução tolete apical)	0,22**	0,06 - 0,75	0,009
hipoclorito 2,5 / (hipoclorito 2,5 + redução tolete apical)	0,69	0,20 - 2,33	0,900
hipoclorito 2,5 / (hipoclorito 2,5 + 2ª desinfecção)	3,19	1,00 - 10,2	0,050
hipoclorito 1,25 / (hipoclorito 2,5 + redução tolete apical)	0,38	0,12 - 1,16	0,120
hipoclorito 1,25 / (hipoclorito 2,5 + 2ª desinfecção)	1,77	0,62 - 5,03	0,500
hipoclorito 1,25 / hipoclorito 2,5	0,55	0,20 - 1,52	0,400

¹: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

²: Inferior – Superior.

Abreviações: IC = Intervalo de Confiança, OR = *Odds Ratio* (Razão de chances).

Em relação à embriogênese somática, houve variações mais expressivas entre os protocolos. O tratamento com hipoclorito a 1,25% apresentou a maior taxa de formação de calos embriogênicos, sendo estatisticamente superior ao protocolo com hipoclorito a 2,5% + segunda desinfecção, cuja chance de formar calos embriogênicos foi 3,22 vezes menor ($p = 0,012$). Os demais protocolos, como o hipoclorito a 2,5% convencional e o hipoclorito a

2,5% + redução do tolete apical, apresentaram desempenhos intermediários, sem diferenças significativas entre si (Tabela 8).

Tabela 8. Comparação entre protocolos de desinfestação (regressão logística) para a variável embriogênese.

Ajustes no Protocolo	OR ¹	95% CI ²	p-valor
(hipoclorito 2,5 + 2 ^a desinfecção) / (hipoclorito 2,5 + redução tolete apical)	0,14***	0,04 – 0,48	<0,001
hipoclorito 2,5 / (hipoclorito 2,5 + redução tolete apical)	1,37	0,81 – 2,32	0,400
hipoclorito 2,5 / (hipoclorito 2,5 + 2 ^a desinfecção)	9,92***	2,82 – 34,90	<0,001
hipoclorito 1,25 / (hipoclorito 2,5 + redução tolete apical)	2,90***	1,68 – 5,03	<0,001
hipoclorito 1,25 / (hipoclorito 2,5 + 2 ^a desinfecção)	21,1***	5,94 – 74,80	<0,001
hipoclorito 1,25 / hipoclorito 2,5	2,12**	1,22 – 3,69	0,003

¹: *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001

²: Inferior – Superior.

Abreviações: IC = Intervalo de Confiança, OR = *Odds Ratio* (Razão de chances).

Esses resultados sugerem que concentrações mais brandas de hipoclorito, como 1,25%, podem preservar melhor a viabilidade dos tecidos para a reprogramação embriogênica. No entanto, esse efeito benéfico parece ocorrer à custa de uma maior suscetibilidade à contaminação, o que deve ser ponderado na escolha do protocolo.

Para a variável quantitativa contínua, rendimento, foi aplicada uma análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey para comparação entre médias.

Reforça-se que esse parâmetro constitui o principal indicador comparativo entre os protocolos, uma vez que sintetiza os efeitos das variáveis anteriores e expressa de forma direta a eficiência prática do sistema. A análise de variância revelou diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ($p < 0,01$) (Tabela 9).

Tabela 9. Estatísticas descritivas e análise de variância para o rendimento por protocolo de desinfecção.

Protocolo de Desinfecção	Média	IC 95% ¹	Grupo (Tukey)
Hipoclorito 2,5% + redução de tolete apical	1,87	1,44 – 2,30	a
Hipoclorito 2,5%	1,08	0,79 – 1,37	b
Hipoclorito 1,25%	1,02	0,81 – 1,23	b
Hipoclorito 2,5% + 2 ^a desinfecção	0,12	-0,02 – 0,25	c

¹: Inferior – Superior.

Abreviações: IC = Intervalo de Confiança.

O protocolo com hipoclorito a 2,5% + redução do número de tolete apical por frasco apresentou o maior rendimento, com média de 1,87 unidades de calos embriogênicos por disco. O teste de Tukey confirmou que este rendimento foi significativamente superior aos demais ($p < 0,05$), consolidando-o como o protocolo mais eficiente entre os avaliados (Figura 10).

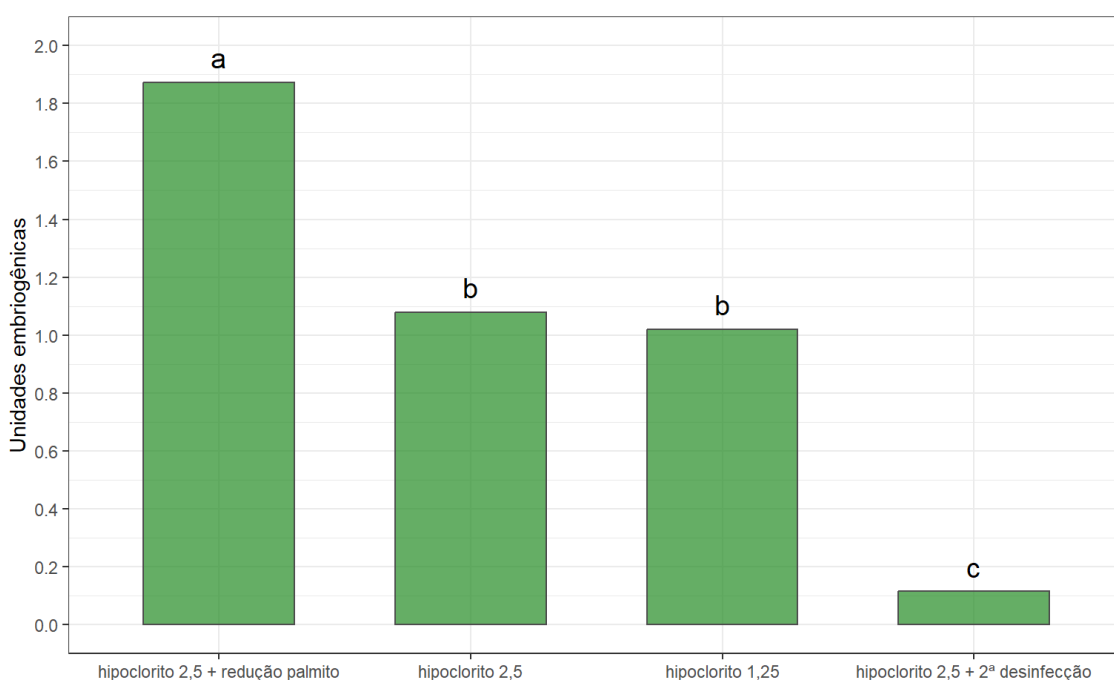


Figura 10. Rendimento médio de calos embriogênicos por disco foliar em função de quatro protocolos de desinfecção aplicados a toletes apicais de cana-de-açúcar. Foram avaliados: hipoclorito 1,25%; hipoclorito 2,5%; hipoclorito 2,5% com segunda desinfecção; e hipoclorito 2,5% associado à redução do número de toletes por frasco. A análise de variância indicou diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,01$), e o teste de Tukey demonstrou que o protocolo com hipoclorito 2,5% e redução de tolete apical obteve rendimento significativamente superior (1,87 unidades por disco; $p < 0,05$). Este resultado evidencia a superioridade do protocolo ao otimizar o rendimento embriogênico, parâmetro que integra os efeitos sobre contaminação, calogênese e embriogênese, consolidando sua eficiência prática para aplicações em cultura de tecidos in vitro.

Além disso, o intervalo de confiança de 95% (1,44 a 2,30) reforça a previsibilidade desse rendimento, permitindo seu uso como referência em experimentos futuros. Utilizar o limite inferior como parâmetro conservador garante segurança no planejamento da quantidade de discos necessária para obtenção de calos embriogênicos em

escalas maiores, reduzindo riscos de subprodução. O alto rendimento também está diretamente associado a menor taxa de contaminação observada nesse tratamento, indicando que o controle sanitário eficaz impacta positivamente todas as etapas subsequentes do cultivo.

A associação entre o hipoclorito de sódio a 2,5% e a redução no número de explantes por frasco revelou-se a estratégia mais eficaz para o controle da contaminação endofítica, assegurando, simultaneamente, a viabilidade e o potencial morfogênico dos explantes. Dessa forma, a descontaminação deve ser concebida como um componente de um sistema integrado, que envolve a escolha criteriosa do material vegetal, a seleção do agente químico e sua concentração, o método de aplicação, bem como as condições físico-ambientais do cultivo.

Como desdobramento futuro, recomenda-se a realização de novos ensaios voltados à identificação dos principais microrganismos endofíticos associados ao material vegetal, com vistas ao delineamento de estratégias de controle mais específicas e eficazes. Com base nesses dados, será possível testar diferentes antibióticos e concentrações adequadas para o manejo das contaminações endofíticas recorrentes. Ademais, sugere-se investigar o uso da canamicina em diferentes concentrações, não apenas para seleção em protocolos de transformação genética, mas também como agente no controle microbiano durante a fase de regeneração.

4.3 REGENERAÇÃO DE PLANTAS

A avaliação da regeneração dos calos embriogênicos foi satisfatória, ainda que nem todas as unidades tenham originado plântulas completas no período estipulado. Esse comportamento pode indicar que parte dos calos iniciou, mas não completou, a formação das estruturas vegetativas necessárias.

Plântulas com parte aérea e raízes bem definidas foram observadas nas fases iniciais da regeneração, indicando um desenvolvimento bipolar, característico da embriogênese somática. Tais estruturas emergiram predominantemente de calos nodulares e esbranquiçados, evidenciando a competência embriogênica desses tecidos. Resultados semelhantes foram descritos por Ho & Vasil (1983), Naz et al., (2017) e Simões et al., (2010) que relataram a formação de brotações a partir de calos com morfologia semelhante, nos primeiros dias do processo regenerativo. No entanto, foram detectadas variações no perfil

morfológico das plântulas mesmo dentro de um mesmo frasco, sugerindo resposta regenerativa heterogênea, apesar de características embriogênicas semelhantes.

Durante o processo de regeneração, foram considerados como calos embriogênicos competentes aqueles que apresentaram capacidade de originar novas plantas. Esses calos, em geral, possuíam coloração branco-amarelada, textura friável e estrutura mais firme ao toque, indicando boa organização celular (Figura 11). Em alguns casos, também foram observadas áreas com tonalidade avermelhada nos estágios iniciais da regeneração, o que pode estar relacionado a alterações fisiológicas características dessa fase.

Por outro lado, os calos classificados como não competentes, ou não embriogênicos, apresentavam coloração tendendo ao marrom-escuro ou branco-acastanhado, além de uma consistência mucilaginosa e pastosa. Essas estruturas se desintegravam facilmente ao toque, sugerindo ausência de características associadas à embriogênese somática. Essas características são compatíveis com estruturas desorganizadas e de baixa coesão celular, frequentemente descritas na literatura como não embriogênicas, conforme relatado por Cidade et al. (2006), Arencibia et al. (1998) e Lima et al. (2001).

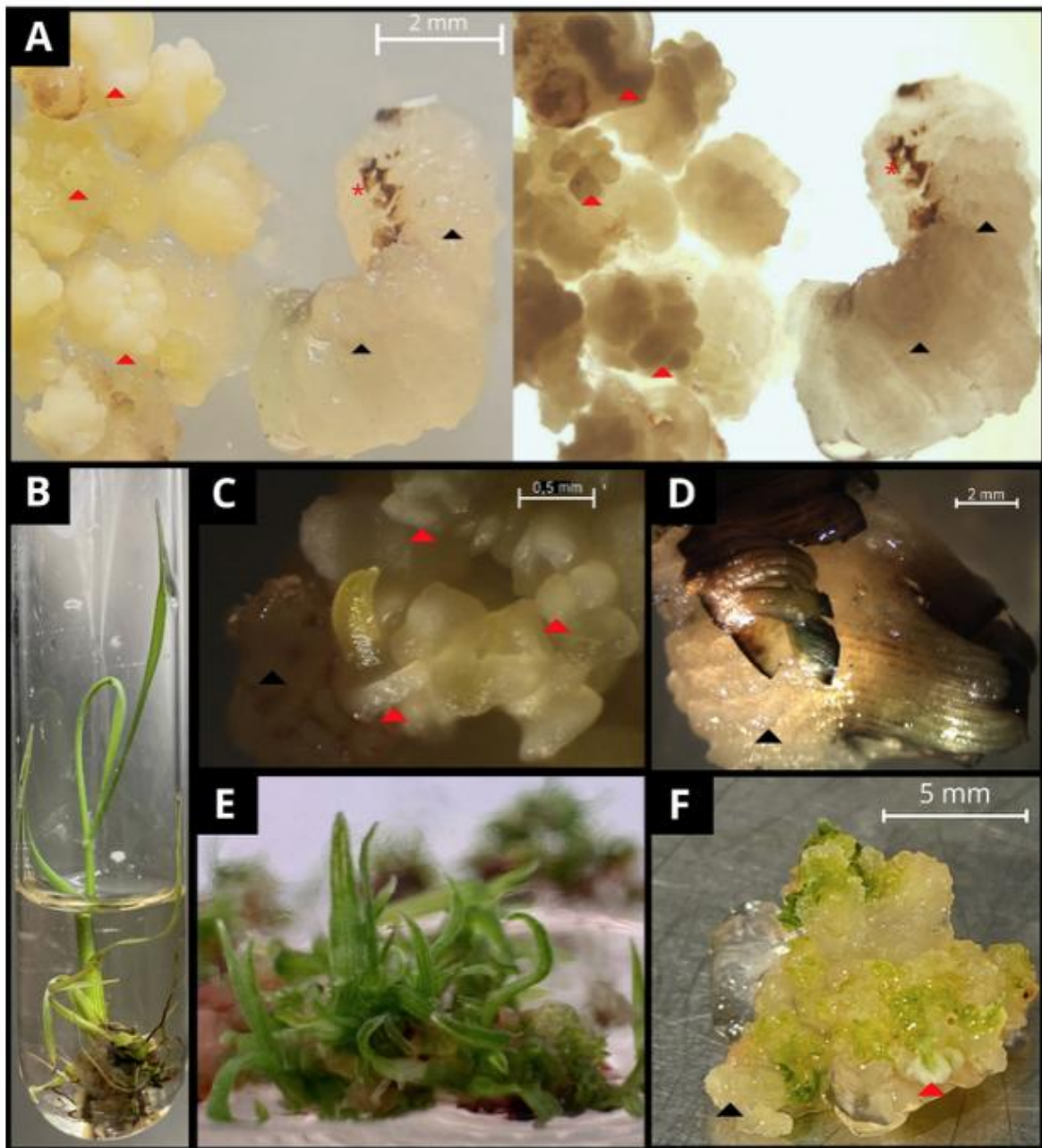


Figura 11. Representações visuais das etapas da embriogênese somática indireta em calos foliares da variedade RB034045 de cana-de-açúcar. (A) Calos no 60º dia de cultivo: duas imagens da mesma amostra, com contraste e iluminação ajustados para destacar a diferenciação morfológica entre calos embriogênicos (setas vermelhas), compactos, nodulares e de coloração branco-amarelada e calos não embriogênicos mucilaginosos (setas pretas), de coloração esbranquiçada e consistência desorganizada. Regiões escurecidas por oxidação estão indicadas por asteriscos (*). (B) Plântula regenerada em meio líquido, apresentando parte aérea e sistema radicular definidos. (C) Plântula no 5º dia de regeneração, em início de alongamento foliar. (D) Massa calosa oxidada e explante foliar sem resposta morfogênica no 30º dia de cultivo. (E) Plântula no 40º dia de regeneração, com estruturas vegetativas bem desenvolvidas. (F) Calo embriogênico no 10º dia de regeneração, com os primeiros sinais de brotação (seta vermelha).

A distinção visual e tátil entre os calos competentes e não competentes mostrou-se, portanto, uma ferramenta prática e eficiente para a triagem inicial de tecidos com potencial embriogênico em protocolos de regeneração *in vitro*.

Foram observadas plântulas aclorofiladas (com folhas brancas ou amareladas), possivelmente decorrentes de variações somaclonais associadas a estresses *in vitro*. Tais alterações podem estar ligadas a mutações em genes relacionados à biossíntese de clorofila (Migneault et al., 2019; Taiz & Zeiger, 2004). O uso do 2,4-D, embora eficaz para indução calogênica, é apontado como promotor de instabilidade genética (Pavlica et al., 1991; Krishna et al., 2016), o que reforça a importância da seleção criteriosa de calos e plântulas a cada repicagem, a fim de evitar a perpetuação de variantes indesejadas.

A maioria dos calos embriogênicos apresentou baixa taxa de oxidação durante os 60 dias de cultivo. Casos pontuais de oxidação superficial ocorreram, sobretudo, em calos que não originaram plântulas. Esse padrão sugere que calos regenerativos são menos propensos à oxidação, o que pode ser explorado como critério morfológico adicional para seleção.

A indução e multiplicação dos calos ocorreu em ambiente escuro, condição que favorece a embriogênese somática, especialmente na presença de 2,4-D a $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Mudry et al., 2013). Maluta et al. (2015) demonstraram que diferentes fontes de luz influenciam a regeneração *in vitro* da cana-de-açúcar, afetando brotações, massa seca e conteúdo de pigmentos. Há relatos de indução organogênica sob luz (Garcia et al.; 2007), porém a ausência de iluminação neste estudo favoreceu claramente a via embriogênica. Fatores endógenos, como a quantidade e afinidade de receptores hormonais, também influenciam a resposta celular à auxina (Calderón Villalobos et al., 2012; Ma et al., 2018), o que justifica a variabilidade observada entre calos cultivados sob as mesmas condições.

Dessa forma, a variedade RB034045 demonstrou aptidão à indução e regeneração via embriogênese somática indireta, confirmando sua viabilidade como material-alvo para protocolos de transformação genética. Estes resultados preliminares sustentam a continuidade dos experimentos, com foco na superação dos gargalos identificados no protocolo base.

4.3.1 Meio de cultura para regeneração plantas: efeito da suplementação na eficiência regenerativa

No protocolo convencional de regeneração, isento de reguladores de crescimento, resultou em uma taxa de regeneração de 53%. Embora promissora, essa taxa foi considerada moderada, situando-se dentro da variação relatada na literatura para cultivares de cana-de-açúcar, como demonstrou Lima et al., (2001), porém sem atingir os valores mais expressivos descritos em alguns estudos como os de Gallo-Meagher e Irvine (1996) e Raza et al., (2012), que obtiveram taxas acima de 70% em linhagens submetidas a diferentes estímulos hormonais.

Com o objetivo de melhorar esses índices, testou-se a suplementação do meio de regeneração com três aditivos: 6-benzilaminopurina (BAP – $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), água de coco comercial ($50 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$) e caseína hidrolisada ($0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Um grupo controle, com a formulação original, foi mantido (Figura 12).

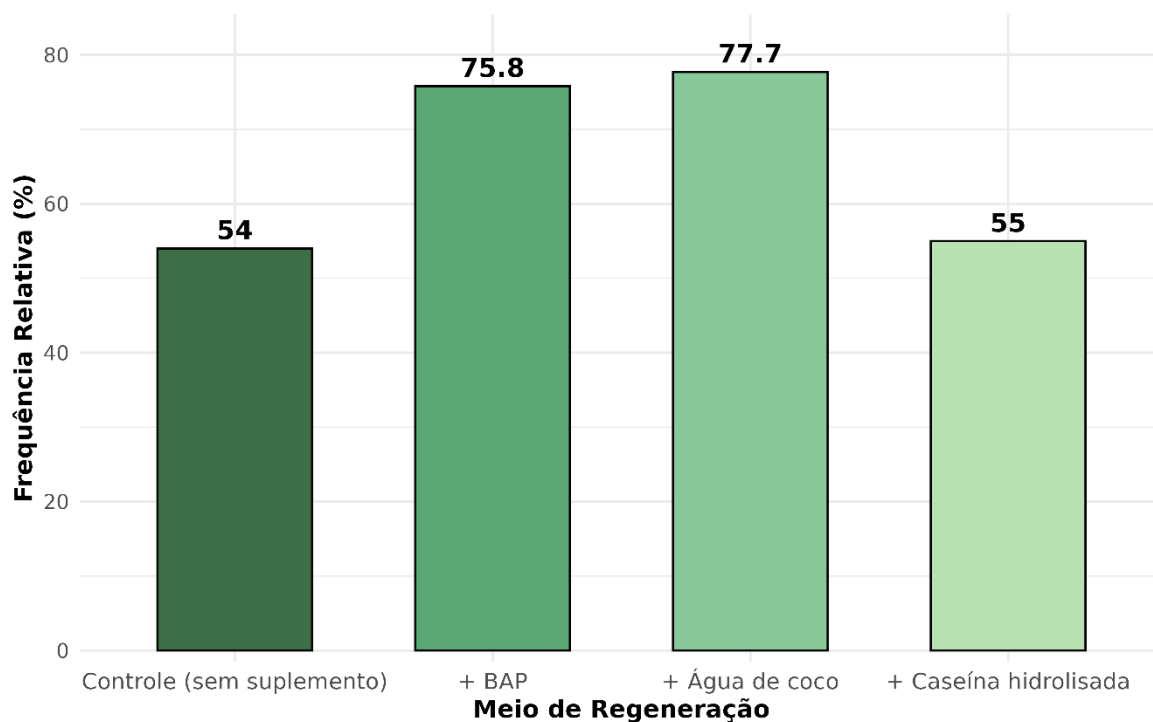


Figura 12. Efeito de diferentes suplementos no meio de regeneração sobre a taxa de regeneração de plântulas a partir de calos embriogênicos da variedade RB034045 de cana-de-açúcar. Foram testadas três formulações suplementadas com $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP, $50 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ de água de coco ou $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de caseína hidrolisada, além do meio controle (sem suplemento).

Os resultados indicaram variações significativas nas taxas de regeneração: o meio controle apresentou 54%; a adição de BAP elevou a taxa para 75,8%; a água de coco

resultou na taxa mais alta, com 77,7%; e a caseína hidrolisada atingiu 55%, sem ganho expressivo na taxa regenerativa.

O BAP demonstrou estímulo claro à Morfogênese, com formação de múltiplos brotos por calo e desenvolvimento vigoroso da parte aérea. Segundo Alcântara et al. (2014), a cultivar RB855156 apresentou maiores taxas de regeneração via embriogênese somática quando submetida a 8,9 e 17,8 μM de BAP, demonstrando maior sensibilidade a esse regulador de crescimento.

A água de coco, reconhecida por sua riqueza em citocininas naturais, açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos (George et al., 2008), promoveu uma regeneração vigorosa, evidenciada pela coloração verde intensa e pelo desenvolvimento consistente de perfilhos. Essa composição nutricional e hormonal confere à água de coco um papel importante como suplemento em meios de cultura *in vitro*. Conforme destacado por Yong et al. (2009), seus constituintes, incluindo vitaminas, minerais e fitormônios, favorecem significativamente o crescimento, a regeneração e o desenvolvimento das plantas. Assim, a incorporação da água de coco no meio de cultura configura-se como uma alternativa natural eficiente para otimização de protocolos *in vitro*, sendo especialmente relevante para espécies economicamente importantes, como a cana-de-açúcar.

Já a caseína, apesar de não aumentar significativamente a taxa de regeneração, favoreceu a formação de plântulas aparentemente maiores, quando comparada ao controle, e bem enraizadas, sugerindo atuação benéfica no metabolismo e na proteção contra estresses oxidativos (Figura 13).

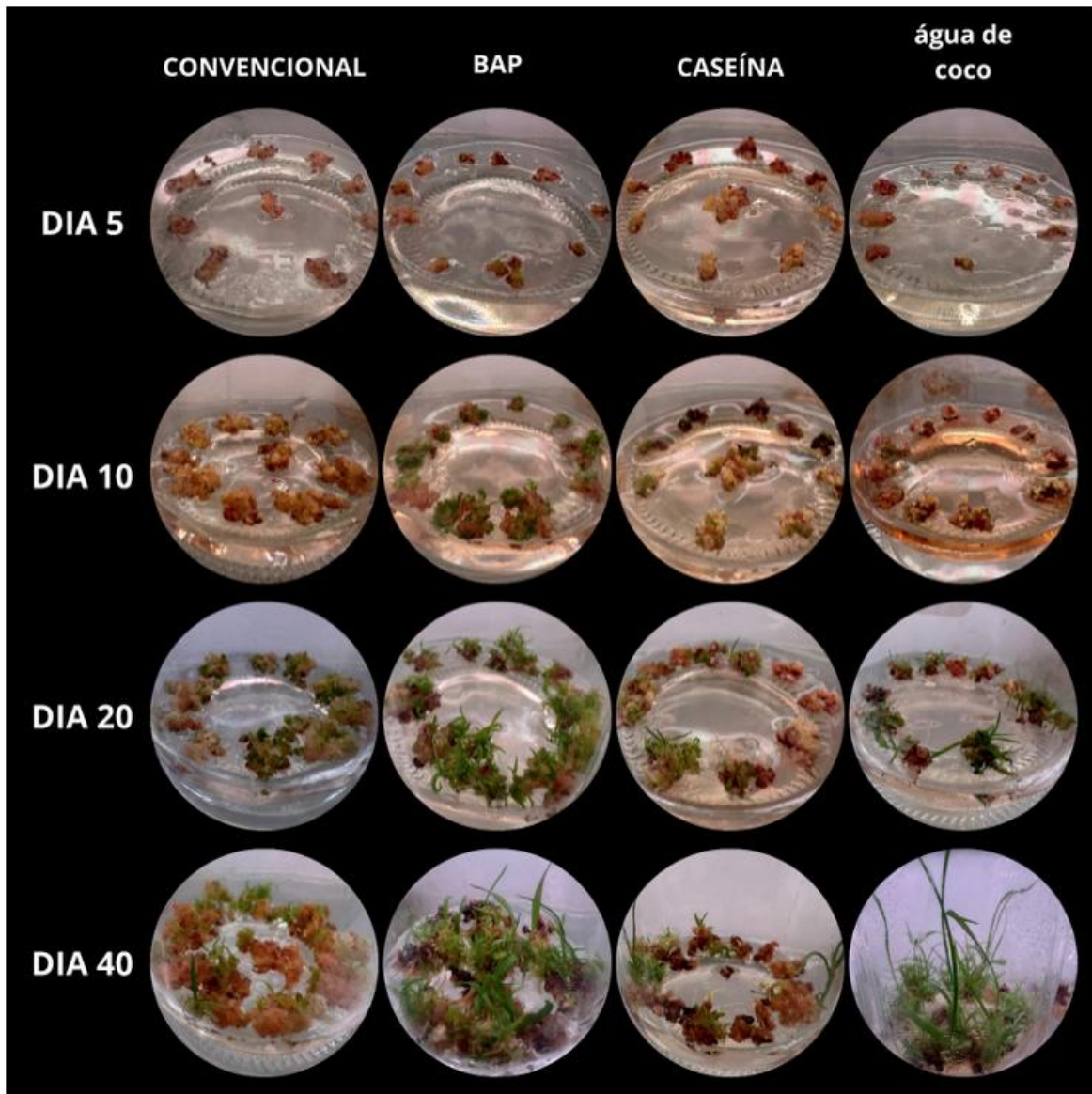


Figura 13. Dinâmica da regeneração de calos embriogênicos de cana-de-açúcar (RB034045) cultivados em diferentes meios: controle (convencional) e meios suplementados com BAP (6-benzilaminopurina), caseína hidrolisada ou água de coco. As imagens ilustram o desenvolvimento morfológico ao longo de 40 dias, com registros nos dias 5, 10, 20 (após repique) e 40 de cultivo. Observa-se a formação inicial de massas calosas e a progressiva emissão de brotos e plântulas, com variações visuais entre os tratamentos em termos de intensidade, velocidade e qualidade da regeneração.

Para avaliar o efeito da adição de diferentes substâncias ao meio de regeneração sobre a taxa de regenerativa de calos embriogênicos de cana-de-açúcar, foi conduzida uma análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste Duncan, adotando-se um nível de significância de 5%. A variável resposta considerada foi a taxa de regeneração, expressa

como a porcentagem de calos embriogênicos capazes de originar plântulas em cada condição testada.

A ANOVA revelou efeito estatisticamente significativo do fator “meio de regeneração” sobre a taxa de regeneração ($p = 0,02949$), indicando que ao menos um dos tratamentos diferiu dos demais quanto à eficiência de regeneração dos calos. Diante dessa significância, foi aplicado o teste Duncan para comparar as médias (Figura 14).

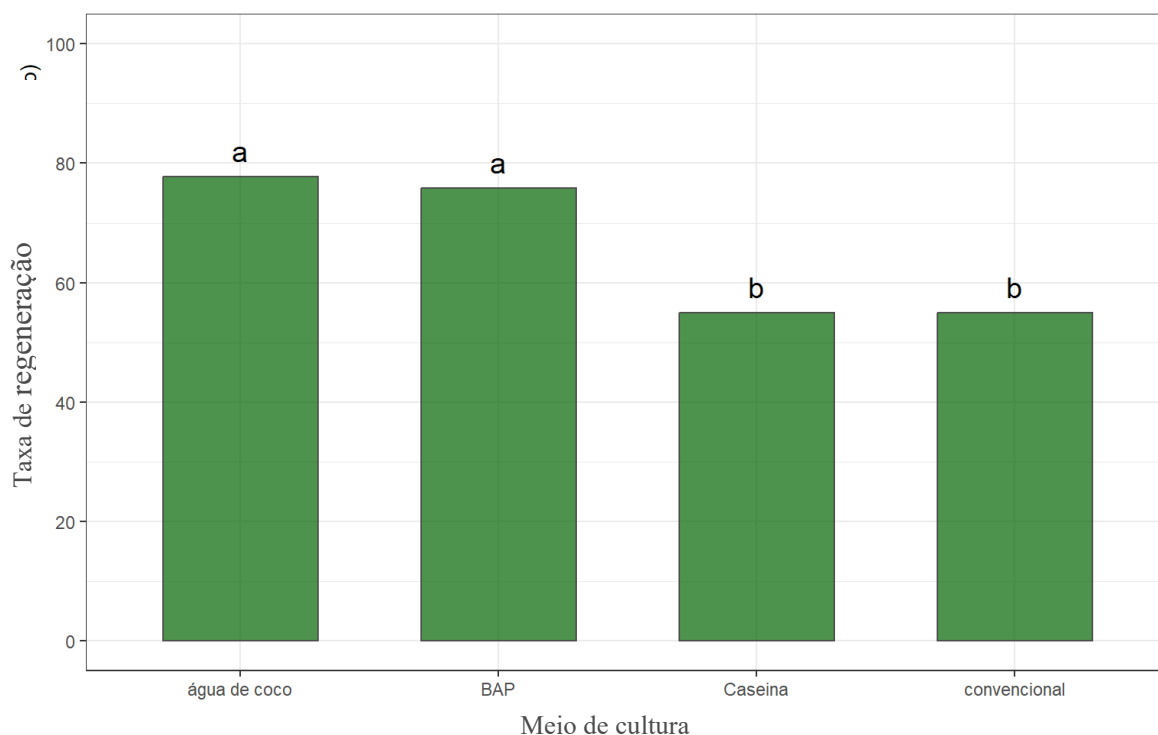


Figura 14. Efeito de diferentes tratamentos no meio de regeneração sobre a taxa de regeneração de calos embriogênicos de cana-de-açúcar (% de calos regenerados em relação aos calos embriogênicos). As letras acima das colunas indicam agrupamentos estatisticamente distintos segundo o teste Duncan. Observa-se que os tratamentos com água de coco e BAP apresentaram as maiores taxas de regeneração, diferindo estatisticamente dos demais.

As médias de taxa de regeneração obtidas foram as seguintes: água de coco (77,78%), BAP (75,83%), caseína hidrolisada (55,00%) e meio convencional (54,00%). Os tratamentos com água de coco e BAP foram agrupados no mesmo grupo estatístico (grupo “a”), sendo superiores em relação à caseína hidrolisada e ao meio convencional, ambos alocados no grupo “b”, sugerindo desempenho inferior.

Observa-se que o uso de água de coco e BAP promoveu um incremento médio de aproximadamente 22,78 e 20,83 pontos percentuais, respectivamente, em comparação ao

meio convencional. Tal resultado pode ser atribuído ao potencial bioestimulante da água de coco, rica em citocininas naturais, além de aminoácidos, açúcares e vitaminas que favorecem a divisão celular e a organogênese. O BAP, por sua vez, é uma citocinina sintética comumente utilizada na regeneração de tecidos vegetais, promovendo a quebra da dominância apical e a indução de brotações em diversos sistemas de cultura *in vitro*.

Apesar de os dados indicarem uma tendência positiva do uso dessas substâncias no aumento da taxa de regeneração, o coeficiente de variação (CV) observado foi de 28,93%, o que evidencia uma variabilidade moderada entre as repetições. Isso reforça a necessidade de experimentos adicionais com maior controle das variáveis e número amostral ampliado para confirmação dos efeitos observados.

Em síntese, os resultados obtidos indicam que a suplementação do meio de regeneração com água de coco ou BAP constitui uma estratégia promissora para aprimorar a eficiência da regeneração de calos embriogênicos em protocolos de transformação genética via biobalística. Tais aditivos demonstraram potencial para estimular a regeneração de calos embriogênicos em plantas, refletindo uma maior taxa regenerativa e melhor qualidade morfológica dos regenerantes. Assim, recomenda-se a inclusão dessas suplementações no meio de regeneração como forma de aumentar a eficiência global do sistema e viabilizar a obtenção de plantas geneticamente modificadas de forma mais consistente.

4.3.2 Concentração inibitória mínima de canamicina na regeneração

Para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de canamicina no sistema de regeneração da cultivar RB034045, foram realizados testes com diferentes dosagens do antibiótico no meio de cultivo (Figura 15). Essa análise é fundamental para definir a menor concentração capaz de bloquear a regeneração de tecidos não transformados, contribuindo para a eficiência de futuros protocolos de seleção em transformação genética.

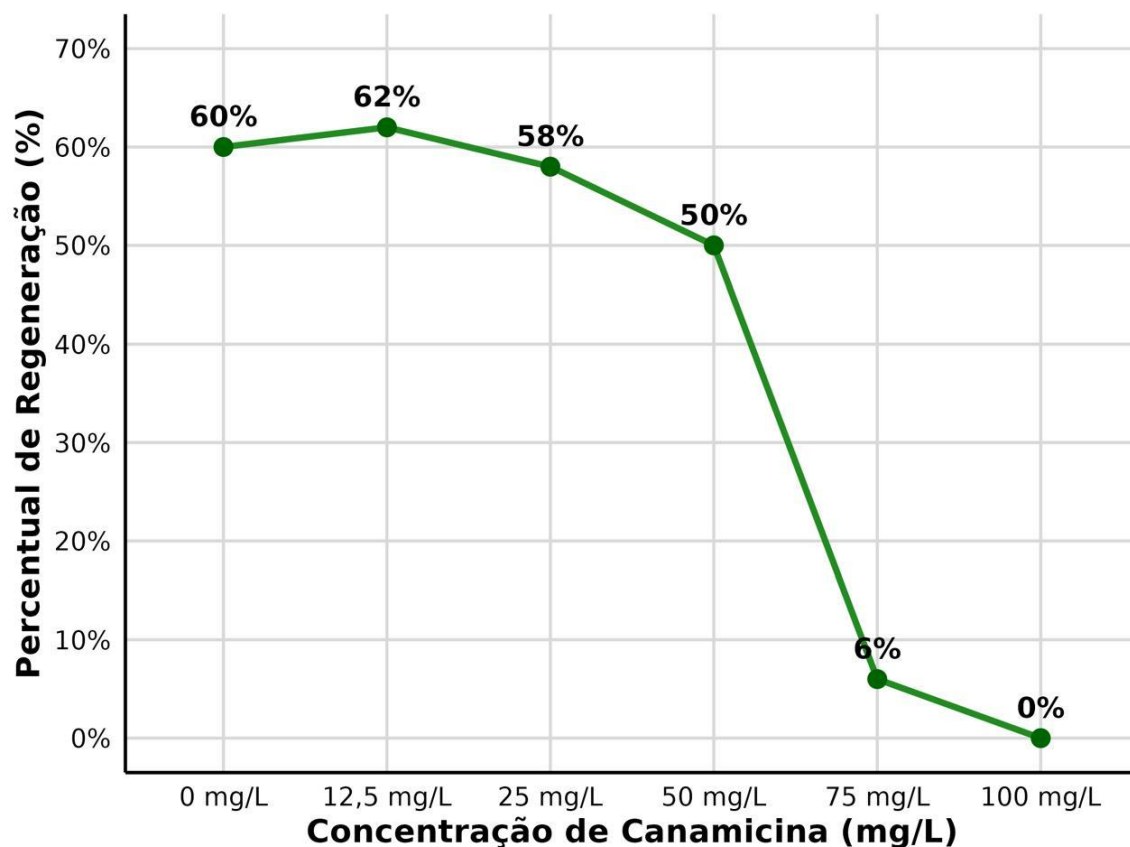


Figura 15. Curva de regeneração de calos embriogênicos de cana-de-açúcar cultivados em meios contendo diferentes concentrações de canamicina. O gráfico exibe o efeito inibitório progressivo do antibiótico sobre a taxa de regeneração, permitindo identificar a faixa adequada para seleção de tecidos transformados.

A regeneração foi progressivamente inibida com o aumento da concentração do antibiótico. Nas faixas de 0 a 50 mg·L⁻¹, as taxas de regeneração variaram entre 50% e 60%. Com 75 mg·L⁻¹, a regeneração caiu drasticamente para 6%, e a 100 mg·L⁻¹ não houve regeneração viável. Embora algumas estruturas tenham surgido nas concentrações mais altas, a maioria apresentava fenótipo aclorofilado (albino ou amarelado), o que indica toxicidade e falha no desenvolvimento funcional. Tais regenerantes foram desconsiderados, pois não apresentaram características compatíveis com plântulas normais.

A presença de estruturas aclorofiladas, especialmente nas maiores concentrações, sugere um efeito deletério da canamicina sobre o sistema fotossintético. Esse tipo de resposta é comum sob pressão seletiva elevada, afetando células parcialmente transformadas ou escapes (Lima et al. 2001).

Além da ausência de regeneração, os calos tratados com concentrações mais altas de canamicina frequentemente necrosaram, com coloração escura e áreas avermelhadas ou pretas, reforçando a toxicidade do antibiótico. Esse efeito está associado a respostas

oxidativas e perda de viabilidade celular (George et al., 2008). Após 60 dias de cultivo, notou-se que plântulas oriundas das concentrações mais baixas apresentavam parte aérea e raiz bem definidas, enquanto aquelas expostas a 50 e 75 mg·L⁻¹ encontravam-se em estágio vegetativo inicial ou apresentavam apenas brotos (Figura 16).



Figura 16. Diferentes estágios de desenvolvimento de calos embriogênicos de cana-de-açúcar (RB034045) ao final de 60 dias de regeneração em meios com concentrações crescentes de canamicina. (A) Plântulas com parte aérea e raiz bem desenvolvidas; (B) Brotos com desenvolvimento parcial; (C) Primórdios vegetativos iniciais. A figura ilustra o impacto do antibiótico na morfogênese, com maior desenvolvimento observado nas concentrações mais baixas e redução progressiva do vigor nas concentrações mais elevadas.

Considerando a necessidade de eliminar completamente calos não transformados, a concentração de 100 mg·L⁻¹ de canamicina foi a mais eficaz, inibindo a regeneração. Esse resultado está em consonância com estudos anteriores, como os de Arencibia et al. (1998), Lakshmanan et al. (2005), Gallo-Meagher e Irvine (1996) e Lima et al., (2001) que utilizaram concentrações próximas como dose seletiva padrão com sucesso.

4.4 DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS EM MEIO LÍQUIDO

Após a indução e regeneração dos calos embriogênicos, foi observada a formação de estruturas semelhantes a plântulas em diversos frascos de cultivo. Essas estruturas foram oriundas diretamente da massa calosa previamente induzida em meio de regeneração, evidenciando o sucesso da embriogênese somática como estratégia para obtenção de plantas completas *in vitro*.

As plântulas regeneradas foram, então, transferidas para tubos de ensaio contendo um meio de cultura específico, formulado para favorecer o crescimento e o desenvolvimento das partes aéreas e radiculares. Durante o período de cultivo nesta nova etapa, foi possível observar um crescimento progressivo das estruturas vegetativas, com alongamento do caule, emissão de folhas e formação de raízes, características indicativas da viabilidade fisiológica e do potencial regenerativo dos calos utilizados.

O índice de perdas por contaminação durante essa fase foi considerado baixo, o que denota a eficácia no manejo adequado em condições assépticas durante os procedimentos de subcultivo. Além disso, observou-se apenas uma discreta oxidação em regiões terminais de algumas plântulas, fenômeno que não comprometeu o desenvolvimento global das mesmas e que pode estar relacionado a respostas fisiológicas normais ao estresse inicial de adaptação ao novo meio de cultivo.

Um fator crítico identificado nesta etapa foi a altura inicial das plântulas no momento da transferência para os meios de cultura em tubos de ensaio. Apenas aquelas que apresentavam porte mínimo suficiente para manter parte de sua estrutura aérea fora da imersão total no meio líquido demonstraram crescimento satisfatório. Por outro lado, as plântulas de menor tamanho, que permaneceram completamente submersas, apresentaram desenvolvimento comprometido, muitas vezes cessando o crescimento ou apresentando sintomas de deterioração.

Esse comportamento pode ser explicado pela limitação na troca gasosa quando as plantas permanecem submersas, além da dificuldade na manutenção da integridade estrutural dos tecidos jovens. Tais observações reforçam a necessidade de se adotar um critério rigoroso quanto ao estágio de desenvolvimento das plântulas selecionadas para esta fase, priorizando-se aquelas com tamanho adequado e estrutura definida.

Portanto, os resultados obtidos nesta etapa evidenciam não apenas o sucesso da regeneração via embriogênese somática, mas também a importância do manejo criterioso

durante a transição para os estágios finais de desenvolvimento *in vitro*, especialmente no que se refere ao tamanho e à posição das plântulas em relação ao meio de cultivo. Esse controle é ainda mais relevante quando se considera a aplicação futura no protocolo de plantas transformadas, nas quais possíveis perdas durante o desenvolvimento podem comprometer significativamente a recuperação de eventos positivos.

4.5 BIOBALÍSTICA: RESULTADOS GERAIS

O sucesso da transformação genética em cana-de-açúcar depende diretamente da adoção de um protocolo eficiente e bem estabelecido de cultura de tecidos, especialmente no que diz respeito à indução e manutenção de calos embriogênicos com alto potencial regenerativo. A embriogênese somática representa uma ferramenta fundamental nesse contexto, pois permite a obtenção de estruturas celulares competentes à regeneração e à incorporação estável de material genético exógeno. O domínio das etapas desse processo, desde a coleta do material vegetal até o desenvolvimento de plantas, é essencial para garantir a eficiência e a reprodutibilidade dos experimentos.

A compreensão detalhada das principais etapas envolvidas na transformação genética da cana-de-açúcar é crucial para o sucesso do processo. O fluxograma apresentado (Figura 17) ilustra esse percurso, destacando os pontos críticos nos quais a introdução do DNA exógeno (biobalística) e as análises subsequentes de expressão gênica devem ser cuidadosamente executadas. A identificação desses momentos-chave é fundamental para otimizar a eficiência da transformação e assegurar resultados consistentes.

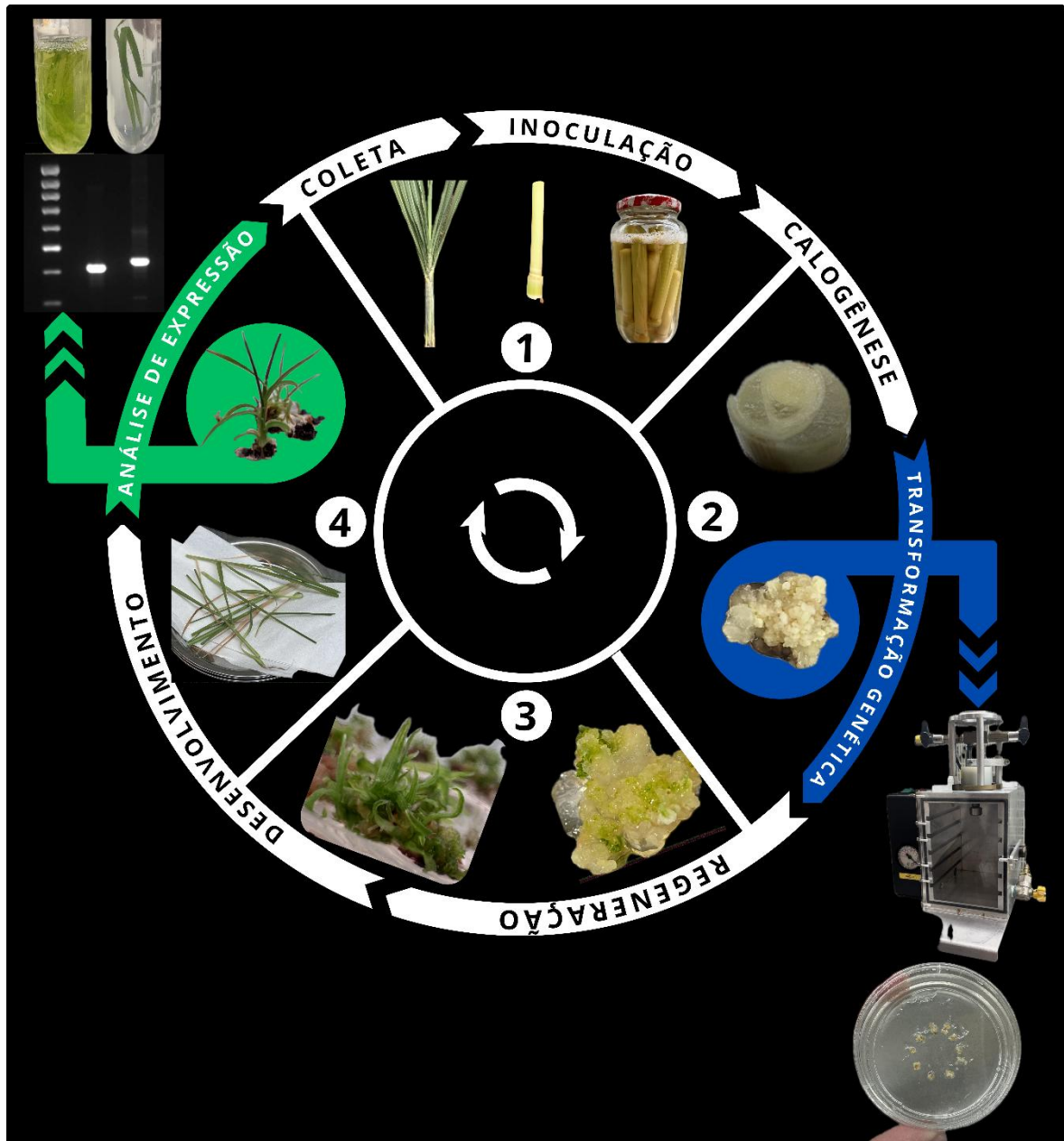


Figura 17. Fluxograma representando as principais etapas do protocolo de transformação genética e regeneração de cana-de-açúcar (cultivar RB034045) mediado por embriogênese somática indireta. O processo inicia-se com: (1) Coleta dos toletes apicais e cultivo em meio de indução; (2) Indução de calos embriogênicos a partir de discos foliares (calogênese); (3) Regeneração de plântulas a partir dos calos; e (4) Desenvolvimento das plantas sob seleção. A transformação genética via biobalística (seta azul) ocorre no final da calogênese, quando os calos embriogênicos atingem o estágio ideal de competência celular (aproximadamente 60 dias após o início do cultivo *in vitro*). A análise de expressão gênica (seta verde) é realizada nas plantas regeneradas, ao final do processo, geralmente após 120 dias. A embriogênese somática atua como etapa-chave, conferindo ao sistema a capacidade de regeneração eficiente e estável das plantas transformadas.

Os resultados da biobalística obtidos nos ensaios de viabilidade e nos testes controle contribuíram de forma significativa para validar as condições do protocolo de transformação genética empregado. No teste de viabilidade, os calos embriogênicos não transformados cultivados em meio regenerativo sem adição de canamicina apresentaram desenvolvimento satisfatório, com formação de plântulas bem definidas, evidenciando o potencial regenerativo do material vegetal utilizado. Esse resultado confirma que, na ausência de pressão seletiva, os calos selecionados mantêm sua capacidade de regeneração, sendo adequados para as etapas posteriores do protocolo.

O controle positivo, composto por calos embriogênicos submetidos ao bombardeamento com micropartículas de tungstênio isentas de DNA e cultivados em meio sem o agente seletivo (canamicina), também foi capaz de originar plântulas regeneradas. Embora o desenvolvimento dessas plântulas tenha sido aparentemente inferior àquelas obtidas no teste de viabilidade (sem exposição ao processo de biobalística), o crescimento observado demonstra que o impacto físico do bombardeamento, por si só, dificulta a regeneração do tecido vegetal.

Esses resultados reforçam a importância desse tipo de controle para diferenciar os efeitos fisiológicos do estresse mecânico gerado pelo procedimento daqueles decorrentes da introdução e expressão do DNA exógeno. Em termos metodológicos, o controle positivo atua como uma referência essencial para validar a eficiência do protocolo de transformação e interpretar com precisão as possíveis causas de variações na regeneração ou no fenótipo observado.

No controle negativo, os calos também bombardeados com partículas sem DNA foram, agora, cultivados em meio contendo canamicina. Neste grupo, não foi observada regeneração, demonstrando a eficácia do antibiótico na inibição do crescimento de tecidos não transformados. A ausência de plântulas confirma que a canamicina atua de forma seletiva, eliminando células que não incorporaram o gene de resistência, o que valida sua aplicação como agente seletivo no protocolo de transformação.

Esses resultados, em conjunto, atestam a funcionalidade das etapas do protocolo adotado, tanto na manutenção da viabilidade dos calos selecionados e utilizados quanto na eficácia do processo de seleção, fornecendo uma base sólida para os experimentos de transformação genética conduzidos nas etapas subsequentes.

Foram conduzidos cinco eventos independentes de transformação genética da cultivar RB034045 de cana-de-açúcar, utilizando a técnica de biobalística. Aproximadamente 1.750 unidades de calos embriogênicos foram submetidas ao bombardeamento com micropartículas de tungstênio revestidas com DNA. Após o período de recuperação, os calos foram transferidos para meio de regeneração contendo $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de canamicina, com o objetivo de promover a seleção das células transformadas.

Os dados obtidos incluem o número total de calos bombardeados por evento e a taxa de calos que originaram estruturas regenerativas, assim como os fenótipos observados nas plântulas resultantes. A regeneração foi observada apenas nos dois últimos eventos, na qual as plantas regeneradas apresentaram fenótipo esbranquiçado. Esses resultados sugerem a regeneração de tecidos oriundos de células parcialmente transformadas (Tabela 10).

Tabela 10. Eficiência de regeneração de calos embriogênicos da cultivar RB034045 de cana-de-açúcar submetidos a transformação genética por biobalística.

Evento de Transformação	Calos Bombardeados	Calos com Regeneração	Regeneração (%)	Fenótipo
1º	350	0	0,00%	-
2º	350	0	0,00%	-
3º	350	0	0,00%	-
4º	350	2	0,57%	Esbranquiçado
5º	350	9	2,57%	Esbranquiçado
Total	1.750	11	0.63%	

Sinais iniciais de regeneração nos calos transformados começaram a ser observados em até 15 dias após a exposição ao agente seletivo. No entanto, ao final de 45 dias, apenas 11 plântulas foram obtidas, resultando em uma taxa de regeneração sob pressão seletiva de 0,63%. As plântulas apresentaram coloração esbranquiçada, ausência de pigmentação foliar e desenvolvimento comprometido, indicando um fenótipo aclorofilado e baixo vigor vegetativo (Figura 18).

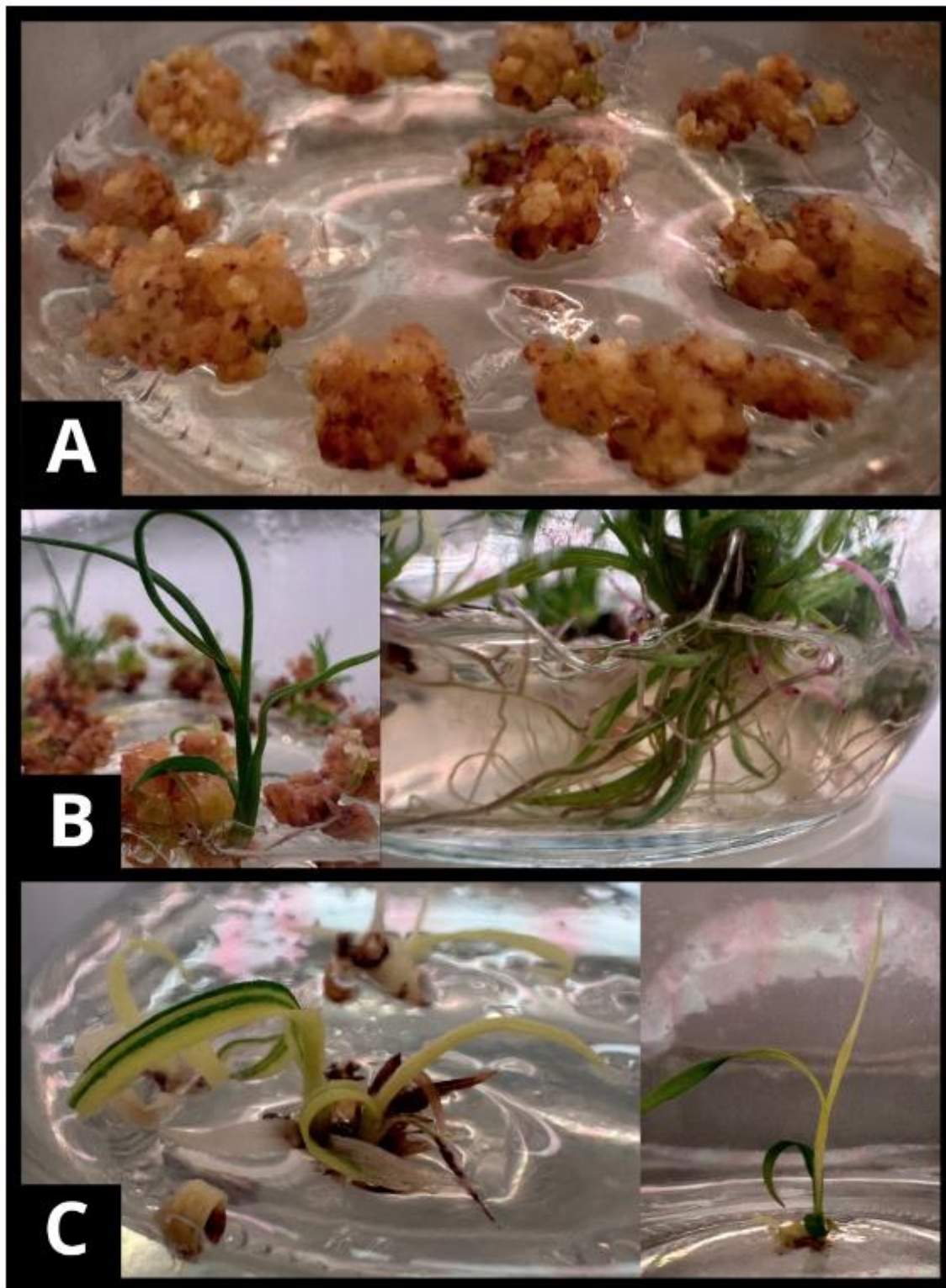


Figura 18. Regeneração de calos embriogênicos de cana-de-açúcar (RB034045) submetidos a diferentes condições de seleção com canamicina. Na imagem (A), observa-se o controle negativo, composto por calos não bombardeados cultivados em meio contendo $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de canamicina, os quais não apresentaram formação de brotos após 45 dias de cultivo. A imagem (B) corresponde ao controle positivo, representado por calos bombardeados com

micropartículas sem DNA e cultivados em meio isento de canamicina, nos quais é possível observar a regeneração de parte aérea e raízes. Por fim, a imagem (C) mostra o ensaio principal, no qual calos foram bombardeados com cassete gênico contendo *cp4-epsps* e *nptII* e cultivados em meio com 100 mg·L⁻¹ de canamicina; todos os regenerantes exibiram fenótipo aclorofilado. À direita, destaca-se a plântula mais desenvolvida, 35 dias após a transferência para o meio sem antibiótico.

Esse desempenho, embora reduzido, está dentro do intervalo reportado na literatura para a cana-de-açúcar, considerada uma espécie que possui variedades possivelmente recalcitrante à transformação, especialmente por biobalística. Estudos como os de Arencibia et al. (1998), Lakshmanan et al. (2005) e Basso et al. (2017) relatam taxas de transformação entre 1% e 5%, dependendo do genótipo e das condições experimentais.

Com o objetivo de aumentar a eficiência do bombardeamento e reduzir os danos letais causados pela alta concentração de partículas no ponto de impacto, as unidades de calo embriogênico (~4 mm) foram distribuídas ao longo da região periférica das placas de Petri, visando evitar a "zona da morte" com alta concentração de partículas. Esse arranjo estratégico permitiu que os calos recebessem a quantidade ideal de partículas de DNA, reduzindo danos físicos excessivos e favorecendo a recuperação pós-bombardeamento. A distribuição uniforme ao longo da borda da placa foi fundamental para garantir a exposição eficiente dos explantes ao processo de transformação, preservando, ao mesmo tempo, a viabilidade celular necessária para a regeneração subsequente

Entretanto, a baixa eficiência observada pode ser atribuída ao estresse físico do bombardeamento e à toxicidade da canamicina, que comprometem a viabilidade celular. Além disso, a biobalística pode causar fragmentações no DNA, inserções múltiplas ou desorganizadas e rearranjos gênicos, dificultando a expressão estável do transgene (Klein et al., 1988).

O fenótipo esbranquiçado/aclorofilado das plântulas regeneradas também sugere possíveis interferências metabólicas causadas pelo processo de transformação. Esses efeitos podem ser decorrentes de mutações, variações somaclonais, alterações epigenéticas ou disfunções em organelas sensíveis ao estresse, como os cloroplastos. Também é possível que haja interferência pleiotrópica da expressão do transgene ou que a integração tenha ocorrido de forma incompleta ou instável.

A ausência de regeneração em muitos calos foi acompanhada de necrose progressiva, especialmente a partir do 10º dia. Em vários casos, observou-se contaminação, provavelmente endógena, associada ao colapso celular e liberação de nutrientes (Leifert &

Waites, 1991). A ação da canamicina, que inibe a síntese proteica, pode ter agravado esse efeito.

4.5.1 Confirmação molecular da integração do gene *cp4-epsps* no genoma da cana-de-açúcar pós biobalística

As plântulas que se desenvolveram em meio seletivo foram analisadas quanto a integração do gene de interesse *cp4-epsps* e do gene de resistência *nptII* no genoma da cana via PCR. Com esse objetivo, fragmentos foliares das plântulas regeneradas em meio com canamicina foram coletados para extração de DNA e análise por PCR utilizando primers específicos para os dois genes. No entanto, nenhuma das amostras analisadas apresentou amplificação do gene de interesse (*cp4-epsps*), indicando que as plantas obtidas possivelmente não continham o transgene.

Por outro lado, observou-se amplificação do gene *nptII*, associado à resistência à canamicina, bem como do gene endógeno do gene EXP11 da expansina da cana (*EXP11F3/EXP11R4*), confirmando a transformação da variedade RB034045 da cana-de-açúcar. A Figura 19 apresenta os resultados das reações de PCR utilizando os primers do gene *nptII*, os quais amplificam um fragmento de 633 pb. Observa-se a amplificação do fragmento a partir do DNA do transformante 05, bem como do vetor pRidesa/RR utilizado como controle positivo, enquanto a amostra de água, empregada como controle negativo, não apresentou amplificação.

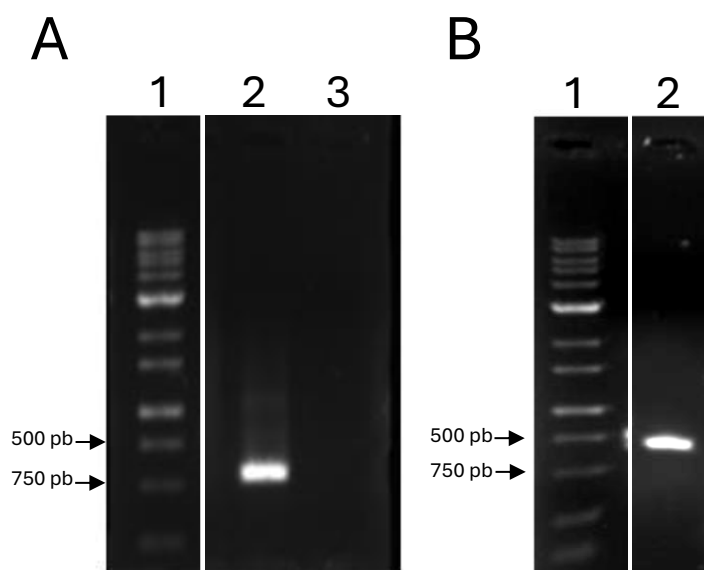


Figura 19: Análise em gel de agarose 0,8 % dos produtos da amplificação por PCR do gene *nptII* a partir do DNA do transformante 5 da variedade RB034045 de cana-de-açúcar. A. 1: Marcador de peso molecular 1Kb, 2: vetor pRidesa/RR, 3: água. B. 1: Marcador de peso molecular 1Kb, 2: DNA do transformante 05 da cana.

Uma possível explicação para a ausência do *cp4-epsps* é a integração parcial do cassete de expressão, uma limitação conhecida da biobalística. Essa técnica, embora eficiente na introdução direta de DNA, pode promover a fragmentação do vetor durante o bombardeamento, o que resulta, em alguns casos, na inserção incompleta do material genético no genoma vegetal. Liu et al. (2019) demonstraram que esse método pode causar rearranjos genômicos e inserção incompleta. Assim, é plausível que apenas o gene de resistência à canamicina (*nptII*), e não o gene de interesse agrônômico, tenha sido funcionalmente integrado.

Diante desses resultados, recomenda-se a realização de novas análises moleculares utilizando primers específicos para *nptII*, com o objetivo de confirmar se a resistência observada nas plântulas à canamicina está de fato relacionada à presença funcional desse gene. Embora essas plantas não possam ser consideradas transformadas com sucesso quanto ao *cp4-epsps*, os dados obtidos confirmam que a cana foi transformada com o gene *nptII*, esses resultados são valiosos para a compreensão do desempenho do sistema de transformação empregado e para o aprimoramento de protocolos futuros.

Apesar de não terem sido obtidas plantas comprovadamente transformadas com gene de interesse, os resultados auxiliam a identificar pontos críticos do protocolo, como o possível ajuste da concentração do agente de pressão seletiva, o refinamento dos parâmetros de bombardeamento e a necessidade de confirmação molecular das regenerações anormais (plantas esbranquiçadas). A observação de plântulas em meio seletivo, sem confirmação por PCR, pode refletir escapes ou respostas fisiológicas transitórias à pressão seletiva fenômeno discutido por autores como Wu et al. (2015) e Hamada et al. (2017).

5 CONCLUSÕES

- Este trabalho apresenta o primeiro protocolo funcional otimizado de embriogênese somática para a variedade RB034045, permitindo a indução de calos embriogênicos e a regeneração de plântulas a partir de segmentos foliares dos toletes cilíndricos apicais da cana-de-açúcar.
- Foi observada formação de calos em uma proporção significativa dos explantes cultivados, sendo parte deles com características morfológicas típicas de embriogenicidade, como coloração esbranquiçada a amarelada, textura compacta e superfície nodular.
- A principal limitação do protocolo inicial foi a alta taxa de contaminação endofítica, contornada pelo aumento da concentração de hipoclorito e redução da densidade de explantes por frasco.
- Compreender a natureza dos microrganismos contaminantes, sua interação com os tecidos vegetais e sua sensibilidade a agentes antimicrobianos é essencial para o desenvolvimento de estratégias de assepsia mais eficazes, complementares à escolha de materiais oriundos de ambientes controlados, como casa de vegetação ou cultivo *in vitro*.
- A região basal do tolete cilíndrico apical apresentou o melhor desempenho morfogênico, com maior taxa de calogênese e rendimento de unidades embriogênicas por explante, destacando a importância da escolha do explante na resposta *in vitro*.
- Na regeneração, os melhores resultados foram obtidos com suplementação com BAP (75,8%) e água de coco (77,7%), evidenciando maior eficiência na conversão dos calos embriogênicos em plantas completas.
- A concentração de 100 mg·L⁻¹ de canamicina foi identificada como inibitória para a regeneração, sendo teoricamente eficaz como agente seletivo em protocolos de transformação genética.

- O número médio de unidades de calos embriogênicos por disco foliar aumentou ao longo dos experimentos, refletindo o aperfeiçoamento progressivo do protocolo, com potencial para aplicação em transformação genética da variedade RB034045.
- Evidência preliminar do azul de metileno como marcador de embriogênese, podendo reduzir o tempo experimental, os custos operacionais e a necessidade de repicagens desnecessárias.
- A aplicação da biobalística possibilitou a regeneração de plântulas a partir de calos embriogênicos cultivados sob meio seletivo, representando um avanço importante no processo de transformação genética. A integração do gene de interesse *cp4-epsps* não foi detectada por PCR, entretanto a integração do gene *nptII* foi detectada, confirmando a transformação da variedade RB034045 da cana-de-açúcar. A integração do vetor pRidesa/RR foi parcial mas esses resultados são valiosos para a compreensão do desempenho do sistema de transformação empregado e para o aprimoramento de protocolos futuros.

6 REFERÊNCIAS

AHMAR, S.; GILL, R. A.; JUNG, K. H.; FAHEEM, A.; QASIM, M. U.; MUBEEN, M. et al. Conventional and molecular techniques from simple breeding to speed breeding in crop plants: recent advances and future outlook. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 7, p. 2590, 2020.

AITKEN, K. S. History and Development of Molecular Markers for Sugarcane Breeding. **Sugar Tech**, v.24, v.1, p.341–353, 2022.

ALCÂNTARA, G. B. D.; DIBAX, R.; OLIVEIRA, R. A. D.; BESPALHOK FILHO, J. C.; DAROS, E. Plant regeneration and histological study of the somatic embryogenesis of sugarcane (*Saccharum* spp.) cultivars RB855156 and RB72454. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 36, p. 63-72, 2014.

ALONI, B.; KARNI, L.; AKTAS, H. Methylene blue increases the tolerance of tomato plants to abiotic stresses. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 85, n. 5, p. 387-393, 2010.

ALMEIDA, R. DE O.; SILVA, S. D. DOS A. E; VARGAS, D. P.; DUTRA, L. F. Indução e regeneração de embriões somáticos de cana-de-açúcar RB996961. **Scientia Agraria Paranaensis, [S. l.]**, v. 14, n. 3, p. 154–159, 2015.

ALVES, C.; OLIVEIRA, J. R.; REIS, E. S.; CORRÊA, R. M.; SILVA, J. C. O.; PAULA, J. C. R. et al. **A cultura de Tecidos na Agricultura**. I Jornada Científica e VI FIPA do Centro Federal de Educação Tecnológica de Bambuí–CEFET-Bambuí, 2008.

ANDERSON, D. J.; BIRCH, R. G. Minimal handling and super-binary vectors facilitate efficient, *Agrobacterium*-mediated, transformation of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid). **Tropical Plant Biology**, v. 5, p. 183-192, 2012.

ARANTES, O. M. N.; AZEVEDO, J. L. A biotecnologia na agropecuária. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 7, n. 2, p. 62-87, 1986.

ARENCEBIA, A. D.; CARMONA, E. R.; TELLEZ, P.; CHAN, M. T.; YU, S. M.; TRUJILLO, L. E. et al. Transgenic sugarcane plants resistant to stem borer attack. **Molecular Breeding**, v. 4, p. 335–344, 1998.

ARENCEBIA, Ariel D. et al. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp. L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Transgenic Research**, v. 7, p. 213-222, 1998.

BARRELL, P. J., MEIYALAGHAN, S., JACOBS, J. M., & CONNER, A. J. Applications of biotechnology and genomics in potato improvement. **Plant Biotechnology Journal**, v. 11, n. 8, p. 907-920, 2013.

BARROS, L. M. Embriogênese Somática. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**, Uberlândia, v.2, n.7, p.36-39, 1999.

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

BASSO, M. F.; DA CUNHA, B. A. D. B.; RIBEIRO, A. P.; MARTINS, P. K.; DE SOUZA, W. R.; DE OLIVEIRA, N. G. et al. Improved genetic transformation of sugarcane (*Saccharum* spp.) embryogenic callus mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Current Protocols in Plant Biology**, v. 2, n. 3, p. 221-239, 2017.

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

BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, 1998. 453 p.

BRITO, Ciro Maia de. **Sugarcane genetic variability for aluminum tolerance**. 2014. 32 f. Tese (Doutorado em Genética animal; Genética molecular e de microrganismos; Genética quantitativa; Genética vegetal; Me) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

BUDEGUER, F.; ENRIQUE, R.; PERERA, M. F.; RACEDO, J.; CASTAGNARO, A. P.; NOGUERA, A. S. et al. Genetic transformation of sugarcane: current status and future prospects. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 12, p. 1–17, 2021.

BUTTERFIELD, M. K. I. J.; IRVINE, J.; GARZA, M. V.; MIRKOV, T. Inheritance and segregation of virus and herbicide resistance transgenes in sugarcane. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, p. 797-803, 2002.

CAIXETA, M. E. S.; DA CUNHA, W. V. Brotação de cana-de-açúcar em meio de cultura a base de MS enriquecido com KIN (Cinetina) e BAP (6-benzilaminopurina). **Perquirere**, v. 21, n. 2, p. 37-43, 2024.

CALDERÓN VILLALOBOS, L, L, S.; DE OLIVEIRA, C.; IVETAC, A.; BRANDT, W.; ARMITAGE, L.; ESTELLE, M. Um sistema combinatório de correceptor TIR1/AFB–Aux/IAA para detecção diferencial de auxina. **Nature Chemical Biology**, v. 8, n. 5, p. 477-485, 2012.

CHEN, W.; ZHANG, Y.; REN, J.; MA, Y.; LIU, Z.; HUI, F. Effects of methylene blue on microspore embryogenesis and plant regeneration in ornamental kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*). **Scientia Horticulturae**, v. 248, p. 1-7, 2019.

CIDADE, D. A. D. P.; GARCIA, R. D. O.; DUARTE, A. C.; SACHETTO-MARTINS, G.; MANSUR, E. Morfogênese in vitro de variedades brasileiras de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 385-391, 2006.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTCIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**, Brasília, DF, v. 13, n. 1, abril 2025.

CUNHA, J. Q.; GOMES, M. E. A. EVOLUÇÃO DA BIOTECNOLOGIA NO CULTIVO DA CANA-DE-AÇUCAR DIANTE DAS VARIABILIDADES CLIMÁTICAS. **Revista Multidisciplinar de Educação e Meio Ambiente**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 14, 2021.

CURSI, D. E.; HOFFMANN, H. P.; BARBOSA, G. V. S.; BRESSIANI, J. A.; GAZAFFI, R.; CHAPOLA, R. G. et al. History and Current Status of Sugarcane Breeding, Germplasm Development and Molecular Genetics in Brazil. **Sugar Tech**, v. 24, n. 1, p. 112–133, 16 fev. 2021.

DA SILVA, E. T.; DE SOUZA, E. P.; SANTOS, R. S.; BARBOSA, M. S. A ENGENHARIA GENÉTICA APLICADA NO MELHORAMENTO DA CANA-DE-AÇÚCAR: UMA NOVA ALTERNATIVA PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL DE SEGUNDA GERAÇÃO [http://dx. doi. org/10.5892/ruvrv. 2011.92. 0323](http://dx.doi.org/10.5892/ruvrv.2011.92.0323). **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 9, n. 2, p. 03-23, 2011.

DA SILVA, P. B. B.; UCHÔA, S. B. B.; TONHOLO, J.; DE ARAÚJO, T. G. L.; FLORENTINO, E. A. P. G.; DE ARAÚJO, V. R. B. S. PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DAS CULTIVARES DE CANA-DE-AÇUCAR DA REDE INTERUNIVERSITÁRIA PARA O DESENVOLVIMENTO DO SETOR SUCROENERGÉTICO-RIDESA. **Cadernos de Prospecção**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 208, 2014.

DAGLA, H. R. Plant Tissue Culture: Historical Developments and Applied Aspects. **Resonance**, Índia, v. 17, n. 08, p. 759-767, 2012.

DANIELS, J.; ROACH, B. T. Taxonomy and evolution. In: HEINZ, D. J. (ed.). *Sugarcane improvement through breeding*. Amsterdam: **Elsevier**, 1987. v. 11, p. 7–84.

DE ANDRADE, S. R. M. Princípios da cultura de tecidos vegetais. **Embrapa Cerrados**, Planaltina - Distrito Federal, ed. 1º, p. 16, 2002.

DE CARVALHO, S. A. D.; FURTADO, A. T. O melhoramento genético de cana-de-açúcar no Brasil e o desafio das mudanças climáticas globais. **Revista Gestão & Conexões**, v. 2, n. 1, p. 22-46, 2013.

DEMETRIO, P. A.; ZONETTI, P. C.; MUNHOZ, R. E. F. Avaliação de Clones de Cana-de-Açúcar Promissores RBs Quanto à Resistência à Broca-da-Cana (*Diatraea Saccharalis*) na Região Noroeste do Paraná. **Iniciação Científica Cesumar**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 13–16, 2008.

DIJOUX, J.; RIO, S.; HERVOUET, C.; GARSMEUR, O.; BARAU, L.; DUMONT, T.; ROTT, P.; D'ONT, A.; HOARAU, J. Y. Unveiling the predominance of *Saccharum*

spontaneum alleles for resistance to orange rust in sugarcane using genome-wide association. **Theoretical and Applied Genetics**, v.137, n.81, p.1-17, 2024.

DILL, G. M. Glyphosate-resistant crops: history, status and future. **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, v. 61, n. 3, p. 219-224, 2005.

DILLON, S. L.; SHAPTER, F. M.; HENRY, R. J.; CORDEIRO, G.; IZQUIERDO, L.; LEE, L. S. Domestication to crop improvement: genetic resources for Sorghum and Saccharum (Andropogoneae). **Annals of Botany**, London, v. 100, n. 5, p. 975-989, July 2007.

DLAMINI, P. J. Drought stress tolerance mechanisms and breeding effort in sugarcane: A review of progress and constraints in South Africa. **Plant Stress**, v. 2, p. 100027, 2021.

DUKE, S. O.; POWLES, S. B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, v. 64, n. 4, p. 319-325, 2008.

ELLIOTT, A. R.; CAMPBELL, J. A.; BRETTELL, R. I. S.; FROF, C. P. L. Agrobacterium-mediated transformation of sugarcane using GFP as a screenable marker. **Functional Plant Biology**, v. 25, n. 6, p. 739-743, 1998.

EID, A.; MOHAN, C.; SANCHEZ, S.; WANG, D.; ALTPETER, F. Multiallelic, targeted mutagenesis of magnesium chelatase with CRISPR/Cas9 provides a rapidly scorable phenotype in highly polyploid sugarcane. **Frontiers in Genome Editing**, v. 3, p. 654996, 2021.

FERREIRA, T. H. S.; TSUNADA, M. S.; BASSI, D.; ARAÚJO, P.; MATTIELLO, G. V.; GUIDELLI, G. V. et al. Sugarcane water stress tolerance mechanisms and its implications on developing biotechnology solutions. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1077, 2017.

FREGONESI, C. **Obtenção de plantas de Cana-de-açúcar geneticamente modificadas superexpressando o gene Dirigente-Jacalina (ShDj)**. 2021. 105 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2021. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/213718>. Acesso em: 9 maio 2025.

FUNKE, T.; HAN, H.; HEALY-FRIED, M. L.; FISCHER, M.; SCHÖNBRUNN, E. Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 35, p. 13010-13015, 2006.

GAINES, T. A.; SLAVOV, G. T.; HUGHES, D.; KKÜPPER, A.; SPARKS, C. D.; OLIVA, J. et al. Investigating the origins and evolution of a glyphosate-resistant weed invasion in South America. **Molecular Ecology**, v. 30, n. 21, p. 5360-5372, 2021.

GALLO-MEAGHER, M.; IRVINE, J. E. Herbicide resistant sugarcane plants by Agrobacterium transformation. **Cell Research**, v. 6, n. 4, p. 385–392, 1996.

GARCIA, R.; CIDADE, D.; CASTELLAR, A.; LIPS, A.; MAGIOLI, C.; CALLADO, C.; MANSUR, E. In vitro morphogenesis patterns from shoot apices of sugar cane are determined by light and type of growth regulator. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 90, p. 181-190, 2007.

GELVIN, Stanton B. Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 67, n. 1, p. 16-37, 2003.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G.J. Plant propagation by tissue culture 3rd Edition. **The Netherland, The Back Ground Springer**, p. 65-175, 2008.

GETNET, B. Review on in vitro propagation of sugarcane to advance the value of tissue culture. **Agri Res Tech: Open Access J**, v. 5, n. 4, p. 555670, 2017.

GHANE, A.; MALHOTRA, P. K.; SANGHERA, G. S.; VERMA, S. K.; JAMWL, N. S.; KASHYAP, L. et al. CRISPR/Cas technology: fueling the future of Biofuel production with sugarcane. **Functional & Integrative Genomics**, v. 24, n. 6, p. 205, 2024.

GITAHY, P. M.; SOUZA, M. T.; MONNERAT, R. G.; ARRIGONI, E. B.; BALDANI, J. I. A Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain highly active to sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 531–537, 2007.

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S. T.; GUARDABASSI, P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. In: **Renewable Energy**. Routledge, 2018. v. 3, p. 321–345.

GONÇALVES, M. C.; PINTO, L. R.; SOUZA, S. C.; LANDELL, M. G. A. Virus diseases of sugarcane. A constant challenge to sugarcane breeding in Brazil. **Functional Plant Science and Biotechnology**, v.6, n.2, p.108-116, 2012.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Apostila de Biotecnologia 1: cultura de tecidos vegetais**. Florianópolis: CCA/UFSC, P.41, 2006.

GUO, J.; GAO, S.; LIN, Q.; WANG, H.; QUE, Y.; XU, L. Transgenic sugarcane resistant to Sorghum mosaic virus based on coat protein gene silencing by RNA interference. **BioMed Research International**, v. 2015, n. 1, p. 861907, 2015.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 895–914, 1997.

HAMADA, H.; LINGHU, Q.; NAGIRA, Y.; MIKI, R.; TAOKA, N.; IMAI, R. An in planta biolistic method for stable wheat transformation. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 11443, 2017.

HANDRO, W.; FLOH, E. I. S. Aspectos básicos do controle da morfogênese in vitro. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**, 1990.

HARTER, A. **Seleção avançada em cana-de-açúcar para tolerância ao déficit hídrico**. 2018. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

HEINRICH, R.; OTTO, R.; MAGALHÃES, A.; MEIRELLES, G. C. Importance of Sugarcane in Brazilian and World Bioeconomy. **Knowledge-Driven Developments in the Bioeconomy**, p. 205–217, 2017.

HEINZ, D. J.; MEE, G. W. P. Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. **Crop Science**, Kampala, v. 9, n. 3, p. 346-348, May/June 1969.

HELEODORO, T.; SILVA, I. C. DE O.; DANTE, R. A.; GERHARDT, I. R.; YASSITEPE, J. E. C. T.; BARIANI, J. M. et al. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE CANA-DE-AÇÚCAR POR *Agrobacterium tumefaciens*. In: 12º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC, 12., 2018. **Anais eletrônicos [...]**. Campinas, Embrapa, 2018. Disponível em: <https://www.cnpma.embrapa.br/eventos/2018/ciic2018/anais2018.html>. Acesso em: 24 mai. 2025.

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.; BEMER, M.; BOUTILIER, K. A transcriptional view on somatic embryogenesis. **Regeneration**, v. 4, n. 4, p. 201–216, ago. 2017.

HU, B.; ZHANG, G.; LIU, W.; SHI, J.; WANG, H.; QI, M. et al. Divergent regeneration-competent cells adopt a common mechanism for callus initiation in angiosperms. **Regeneration**, v. 4, n. 3, p. 132-139, 2017.

HUSSIN, S. H.; LIU, X.; LI, C.; DIABY, M.; JATOI, G. H.; AHMED, R. et. An updated overview on insights into sugarcane genome editing via CRISPR/Cas9 for sustainable production. **Sustainability**, v. 14, n. 19, p. 12285, 2022.

IKEUCHI, M.; SUGIMOTO, K.; IWASE, A. Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression. **The Plant Cell**, v. 25, n. 9, p. 3159–3173, set. 2013.

INGELBRECHT, Ivan L.; IRVINE, James E.; MIRKOV, T. Erik. Posttranscriptional gene silencing in transgenic sugarcane. Dissection of homology-dependent virus resistance in a monocot that has a complex polyploid genome. **Plant physiology**, v. 119, n. 4, p. 1187-1198, 1999.

JESUS, A. M. S.; VILLA, F.; LARA, A. C. D. C. PASQUAL, M. et al. Avaliação do efeito das concentrações de sacarose e dos estádios de desenvolvimento do fruto no cultivo *in vitro* de embriões de frutos de cafeeiro. **Revista Ceres**, v. 58, n. 6, p. 679–684, 2011.

JIMÉNEZ, V. M. Involvement of Plant Hormones and Plant Growth Regulators on *in vitro* Somatic Embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, v. 47, n. 2-3, p. 91–110, nov. 2005.

JOSHI, A.; VERMA, K. K.; RAJPUT, V. D.; MINKINA, T.; ARORA, J. Recent advances in metabolic engineering of microorganisms for advancing lignocellulose-derived biofuels. **Bioengineered**, v. 13, n. 4, p. 8135-8163, 2022.

JOSHI, R.; KUMAR, P. Regulation of somatic embryogenesis in crops: a review. **Agricultural Reviews**, v. 34, n. 1, p. 1-20, 2013.

JOYCE, P.; HERMANN, S.; O'CONNELL, A.; DINH, Q.; SHUMBE, L.; LAKSHMANAM, P. Field performance of transgenic sugarcane produced using Agrobacterium and biolistics methods. **Plant biotechnology journal**, v. 12, n. 4, p. 411-424, 2014.

KANDEL, R.; SONG, J.; WANG, J. Potentials, challenges, and genetic and genomic resources for sugarcane biomass improvement. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 151, 2018.

KLEIN, T. M.; FROMM, M.; WEISSINGER, A.; TOMES, D.; SCHAAF, S.; SLETTEN, M. et al. Transfer of foreign genes into intact maize cells with high-velocity microprojectiles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 12, p. 4305-4309, 1988.

KUMAR, S.; HOLKAR, S. K.; KHAN, M. S. Técnica de micropropagação para o desenvolvimento de cana-semente livre de doenças e geneticamente uniforme. **Indian Farming**, v. 67, n. 2, 2017.

KORTSTEE, A. J.; KHAN, S. A.; HELDERMAN, C.; TRINADADE, L. M.; WU, Y.; VISSER, R. G. F. et al. Anthocyanin production as a potential visual selection marker during plant transformation. **Transgenic research**, v. 20, p. 1253-1264, 2011.

KRISHNA, H.; ALIZADEH, M.; SINGH, D.; SINGH, U.; CHAUHAN, N.; EFTEKHARI, M. et al. Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. **3 Biotech**, v. 6, n. 1, p. 54, 2016.

KUMAR, T.; WNAG, J. G.; XU, C. H.; LU, X.; MAO, J.; LIN, X. Q. et al. Genetic engineering for enhancing sugarcane tolerance to biotic and abiotic stresses. **Plants**, v. 13, n. 13, p. 1739, 2024.

LAKSHMANAN, P.; DEDICOVA, B.; BERMÚDEZ, C.; PRIAS, S. R.; ZUNIGA, E.; BRONDANI, C. Transformation and regeneration of transgenic sugarcane plants with the *nptII* gene using microprojectile bombardment. **Plant Cell Reports**, v. 24, p. 462-469, 2005.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R. J.; WANG, L.; ELLIOTT, A.; GROF, C. P. L.; BERDING, N.; SMITH, G. R. 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.

LEIFERT, C.; RITCHIE, J. Y.; WAITES, W. M. Contaminants of plant-tissue and cell cultures. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 7, n. 4, p. 452-469, 1991.

LI, Q.; KIAN, C.; PENG, S.; WNAG, J. P.; QU, G. Z.; SEDEROFF, R. R. et al. Plant biotechnology for lignocellulosic biofuel production. **Plant biotechnology journal**, v. 12, n. 9, p. 1174-1192, 2014.

LI, C.; LI, X.; LIN, X.; QIN, W.; LU, X.; MAO, J. et al. Genotypic variation in the response to embryogenic callus induction and regeneration in *Saccharum spontaneum*. **Plant Genetic Resources**, v. 19, n. 2, p. 153-158, 2021.

LIU, J.; NANNAS, N. J.; FU, F. F.; SHI, J.; ASPINWALL, B.; PARROTT, W. A. et al. Genome-scale sequence disruption following biolistic transformation in rice and maize. **The Plant Cell**, v. 31, n. 2, p. 368-383, 2019.

LIMA, M. A. C.; GARCIA, R. O.; MARTINS, G. S.; MANSUR, E. Morfogênese in vitro e suscetibilidade de calos de variedades nacionais de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) a agentes seletivos utilizados em sistemas de transformação genética. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, p. 73-77, 2001.

LOPES, A. B.; SOUSA, B. B.; OLIVEIRA, R. A. P. de.; GUIMARÃES, C. R. R.; CERQUEIRA, F. B. Avaliação tecnológica de quatro cultivares de cana-de-açúcar em função da infestação de *Diatraea saccharalis* em Pedro Afonso, TO - estudo de caso. **Research, Society and Development**, v. 11, n.13, e340111335388, 2022.

LOYOLA-VARGAS, V. M. The history of somatic embryogenesis. **Somatic embryogenesis: fundamental aspects and applications**, p. 11-22, 2016.

MA, Q.; GRONES, P.; ROBERT, S. Auxin signaling: a big question to be addressed by small molecules. **Journal of Experimental Botany**, v. 69, n. 2, p. 313-328, 2018.

MALUTA, F. A.; BORDIGNON, S. R.; ROSSI, M. L.; AMBROSANO, G. M. B.; RODRIGUES, P. H. V. Cultivo in vitro de cana-de-açúcar exposta a diferentes fontes de luz. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 48, p. 1303-1307, 2013.

MANICKAVASAGAM, M.; GANAPATHI, A.; ANBAZHAGAN, V. R.; SUDHAKAR, B.; SELVARAJ, N.; VASUDEVAN, A. et al. Agrobacterium-mediated genetic transformation and development of herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum* species hybrids) using axillary buds. **Plant cell reports**, v. 23, p. 134-143, 2004.

MARTINS, R.C.R. **Associações in vitro de bactérias endofíticas diazotróficas com células de calo de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. 81 p.

MEDRADO, L. C.; SANTOS, G. G.; CORRECHEL, V.; DA SILVA, G. C.; FLORES, R. A.; SEVERIANO, E. C. et al. Evaluation of Sugarcane Root Growth Through Images Obtained via the Minirhizotron Method in a Ferralsol in the Midwest Region of Brazil. **Sugar Tech**, v. 25, n. 3, p. 638-652, 2023.

MÉNDEZ-HERNÁNDEZ, H. A.; LEDEZMA-RODRÍGUEZ, M.; AVILEZ-MONTALVO, R. N.; JUÁREZ-GÓMEZ, Y. L.; SKEETE, A.; AVILEZ-MONTALVO, J. et al. Signaling Overview of Plant Somatic Embryogenesis. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, 7 fev. 2019.

MIGNEAULT, A.; SANDHU, H.; MCCORD, P.; ZHAO, D.; & ERICKSON, J. Albinism in sugarcane: significance, research gaps, and potential future research developments. **Sugar Tech**, v. 21, p. 536-541, 2019.

MIGUEL, C.; MARUM, L. An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: somaclonal variation and beyond. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 11, p. 3713-3725, mai. 2011.

MOHAN, C.; EASTERLING, M.; YAU, Y. Y. Gene editing technologies for sugarcane improvement: opportunities and limitations. **Sugar Tech**, v. 24, n. 1, p. 369-385, 2022.

MOLINARI, H. B. C.; MARUR, C. J.; DAROS, E.; DE CAMPOS, M. K. F.; DE CARVALHO, J. F. R. P.; FILHO, J. C. B. et al. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, v. 130, n. 2, p. 218-229, 2007.

MORAES, E. R.; DOMINGUES, L. A. S.; MEDEIROS, M. H.; PEIXOTO, J. V. M.; LANA, R. M. Q. Produtividade e características agronômicas da cana-de-açúcar em diferentes sistemas de preparo do solo. **Revista de Agricultura Neotropical**, v.3, n.1, p. 27-31, 2016.

MORAIS, L., K.; CURSI, D., E.; SANTOS, J. M.; et al. **Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2015. 38 p.

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

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NAZ, M.; SUGHAR, G.; SOOMRO, Z. A.; AHMED, I.; SEEMA, N.; NIZAMANI, G. S. et al. Somatic embryogenesis and callus formation in sugarcane (*Saccharum* SPP L.) using different concentration of 2, 4-D and RAPD analysis of plants regenerates. **Indian Journal of Agricultural Research**, v. 51, n. 2, p. 93-102, 2017.

NEVES, N.; SEGURA-NIETO, M.; BLANCO, M. A.; SÁNCHEZ, M.; GONZÁLEZ, A.; GONZÁLEZ, J. L. et al. Biochemical characterization of embryogenic and non-embryogenic calluses of sugarcane. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 39, p. 343-345, 2003.

O'CONNEL, A.; DEO, J.; DEOMANO, E.; WEI, X.; JACKSON, P.; AITKEN, K. S.; MANIMEKALAI, R.; MOHANRAJ, K.; HEMAPRABHA, G.; RAM, B.; VISWANATHAN, R.; LAKSHMANAN, P. Combining genomic selection with genome-wide association analysis identified a large-effect QTL and improved selection for red rot resistance in sugarcane. **Frontiers in Plant Science**, v.13, p.1-16, 2022.

PAVLICA, M.; PAPEŠ, D.; NAGY, B. 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid causes chromatin and chromosome abnormalities in plant cells and mutation in cultured mammalian cells. **Mutation Research Letters**, v. 263, n. 2, p. 77-81, 1991.

PIZELLA, D. G.; DE SOUZA, M. P. Regulação de OGMs no Brasil: aproximações com o modelo da União Europeia ou dos EUA?. **Desenvolv. Meio Ambiente**, 2016.

POLITANO, A. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de cana-energia visando estabilidade genética de transgenes**. 2021. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2021. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11144/tde-30032021-142549/>. Acesso em: 09 abr. 2025.

PRADO, G. S.; ROCHA, D. C.; SANTOS, L. N.; CONTILIANI, D. F., NOBILI, P. M.; MARTINATI-SCHENK, J. C. et al. CRISPR technology towards genome editing of the perennial and semi-perennial crops citrus, coffee and sugarcane. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1331258, 2024.

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

RAMIRO, D. A.; PASSARIN-MELOTTI, D. M.; BARBOSA, M. A.; SANTOS, F.; GOMEZ, S. G. P.; JUNIOR, N. S. M. et al. Expression of Arabidopsis Bax Inhibitor-1 in transgenic sugarcane confers drought tolerance. **Plant Biotechnology Journal**, v. 14, n. 9, p. 1826-1837, 2016.

RAO, A. S. Callus induction and organogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) var 93v297. **International Letters of Natural Sciences**, v. 48, 2015.

RASHID, A. H. A.; LATEEF, D. D. Novel techniques for gene delivery into plants and its applications for disease resistance in crops. **American Journal of Plant Sciences**, v. 7, n. 1, p. 181-193, 2016.

RAZA, S., QAMARUNISA, S., HUSSAIN, M., JAMIL, I., ANJUM, S., AZHAR, A. et al. Regeneration in sugarcane via somatic embryogenesis and genomic instability in regenerated plants. **Journal of crop science and biotechnology**, v. 15, p. 131-136, 2012.

RECH, E. L.; ARAGÃO, F. J. L. Biobalística. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-Cenargen, p. 51-74, 1998.

RIBEIRO, A. P. **Transformação de *Setaria viridis* e *Saccharum spp.* com o gene MATE visando tolerância ao alumínio.** 2016. 155 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) -Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

RIBEIRO, A. P.; VINECKY, F.; DUARTE, K. E.; SANTIAGO, T. R.; CASARI, R. A. C. N. C.; HELL, A. F. et al. Enhanced aluminum tolerance in sugarcane: evaluation of SbMATE overexpression and genome-wide identification of ALMT s in *Saccharum spp.* **BMC Plant Biology**, v. 21, p. 1-15, 2021.

RIDESA. **CATÁLOGO NACIONAL DE VARIEDADES “RB” DE CANA-DE-AÇÚCAR.** Curitiba, 2010. 136 p. RIDESA. *Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético.* Disponível em: <https://www.ridesa.com.br/>. Acesso em: 27 mar. 2025.

ROSA-SANTOS, T. M.; DA SILVA, R. G.; KUMAR, P.; KOTTAPALLI, P.; CRASTO, C.; KOTTAPALLI, K. R. et al. Molecular mechanisms underlying sugarcane response to aluminum stress by RNA-Seq. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 21, p. 7934, 2020.

SALGUEIRO LAGE, C. L.; ESQUIBEL, M. A. Growth stimulation produced by methylene blue treatment in sweet potato. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 48, p. 77-81, 1997.

SANDHU, S. K.; GOSAL, S. S.; THIND, K. S.; UPPAL, S. K.; SHARMA, B.; MEETA, M. et al. Field performance of micropropagated plants and potential of seed cane for stalk yield and quality in sugarcane. **Sugar tech**, v. 11, p. 34-38, 2009.

SANTANA, M. O. **Expressão gênica da resposta à seca em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*).** 2011. 98 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

SANTOS, F.; BORÉM, A. **Cana-de-açúcar: do plantio à colheita.** Viçosa: Ed. UFV, 290 p. 2016.

SCARPARI, M. S.; BEAUCLAIR, E. G. Fisiologia da parte aérea. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; ANDRADE LANDELL, M.G. de; VASCONCELOS, A.C.M. de (Ed.). **Cana-de-açúcar.** Campinas: Instituto Agrônômico, 2008. cap. 2, p. 47-56.

SHABBIR, R.; JAVED. T.; AFZAL, I.; SABAGH, A. E.; ALI, A.; VICEMTE, O. et al. Modern biotechnologies: Innovative and sustainable approaches for the improvement of sugarcane tolerance to environmental stresses. **Agronomy**, v. 11, n. 6, p. 1042, 2021.

SILVA, M. I. **Embriogênese somática indireta de duas variedades RB de cana-de-açúcar.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Alagoas. Rio Largo – AL, 86p, 2012.

SIMÕES, C.; ALBARELLO, N.; CALLADO, C. H.; CASTRO, T. C. D.; MANSUR, E. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of *Cleome rosea* Vahl. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 679-686, 2010.

- SNYMAN, S. J.; MEYER, G. M.; RICHARDS, J. M.; HARICHARAN, N.; RAMGAREEB, S.; HUCKETT, B. I. Refining the application of direct embryogenesis in sugarcane: effect of the developmental phase of leaf disc explants and the timing of DNA transfer on transformation efficiency. **Plant cell reports**, v. 25, p. 1016-1023, 2006.
- SOARES, F. U.; PRANKE, L. V.; BARCELLOS, J. T.; ZARNOTT, D. H.; ALBA, J. M. F. Situação socioeconômica da cultura de cana-de-açúcar. In: ALBA, José Maria Filippini; FLORES, Carlos Alberto (Eds.). **Zoneamento edáfico da cana-de-açúcar para o estado do Rio Grande do Sul**. Brasília: Embrapa Clima Temperado, 2013. p. 3-5.
- SOSA, M. M.; GIAMPAOLI, G.; PALACIO, G. C.; SERINO, G.; PONS, A. B. S. Advances in genome editing of sugarcane using als genes as a model. **Sugar Tech**, v. 27, n. 1, p. 173-178, 2025.
- STEWART, F. C.; MAPES, M. O.; MEARS, K. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. **American Journal of Botany**, p. 705-708, 1958.
- SURYA KRISHNA, S.; CHANDER, S. R. C.; RAVI, M.; VALARMATHI, R.; LAKSHMI, K.; PRATHIMA, P. T. et al. Transgene-free genome editing for biotic and abiotic stress resistance in sugarcane: prospects and challenges. **Agronomy**, v. 13, n. 4, p. 1000, 2023.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- TERMIGNONI, Regina Ramos. **Cultura de Tecidos Vegetais**. Porto Alegre, Editora da UFRGS, 2005, 182 p.
- THORAT, A. S.; SONONE, N. A.; CHOUDHARI, V. V.; DEVARUMATH, R. M.; BABU, K. H. Regeneração de plantas a partir de cultura em suspensão celular de *Saccharum officinarum* L. e determinação da fidelidade genética por meio de marcadores RAPD e ISSR. **3 Biotech**, v. 7, p. 1-12, 2017.
- THORPE, T. A. history of plant tissue culture. **Molecular Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 169-180, 27 jun. 2007.
- TORRES, A. C.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S. **Cultura de tecidos e Transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA – SPI/ CNPH, 1999. v.1, 509p.
- VAN DER VYVER, C. Genetic transformation of the euploid *Saccharum officinarum* via direct and indirect embryogenesis. **Sugar Tech**, v. 12, p. 21-25, 2010.
- VERMA, K K.; SONG, X. P.; YADAV, G.; DEGU, H. D.; PARVAIZ, A.; SINGH, M. et al. Impact of agroclimatic variables on proteogenomics in sugar cane (*Saccharum* spp.) plant productivity. **Acs Omega**, v. 7, n. 27, p. 22997-23008, 2022.

VENTURIERI, G. A.; VENTURIERI, G. C. Calogênese do híbrido *Theobroma grandiflorum* x *T. obovatum* (Sterculiaceae). **Acta Amazonica**, v. 34, n. 4, p. 507–511, dez. 2004.

WANG, Q.; WANG, L. An evolutionary view of plant tissue culture: somaclonal variation and selection. **Plant cell reports**, v. 31, p. 1535-1547, 2012.

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

YONG, J. W., GE, L.; N. G. Y. F.; TAN, S. N. The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. **Molecules**, v. 14, n. 12, p. 5144–5164, 2009.

ZHANG, G.; LIU, X.; QUAN, Z.; CHENG, S.; XU, X.; PAN, S. et al. Genome sequence of foxtail millet (*Setaria italica*) provides insights into grass evolution and biofuel potential. **Nature Biotechnology**, New York, v. 30, n. 6, p. 549-554, May 2012.

ZHANG, L.; XU, J.; BIRCH, R. G. Engineered detoxification confers resistance against a pathogenic bacterium. **Nature biotechnology**, v. 17, n. 10, p. 1021-1024, 1999.

ZHOU, D.; LIU, X.; GAO, S.; GUO, J.; SU, Y.; LING, H. et al. Integration of foreign *cry1Ac* gene and endogenous borer stress-related genes synergistically enhances insect resistance in sugarcane. **BMC Plant Biology**, vol. 18, article number 122, 2018.

ZHOU, L.; ZENG, X.; YANG, Y.; LI, R.; ZHAO, Z. Applications and Prospects of CRISPR/Cas9 Technology in the Breeding of Major Tropical Crops. **Plants**, v. 13, n. 23, p. 3388, 2024.