

Brasília, DF
Dezembro 2007

Autores

Gláucia Barbosa Cabral
Recursos Genéticos e
Biotecnologia, Brasília-DF,
Brasil,

Láynhon de Oliveira
Estudante de Ciências
Biológicas, Faculdades
Integradas da Terra de
Brasília, FTB.

Ana Luiza Machado Lacerda
Bolsista de DTI do CNPq

Vera Tavares de Campos
Carneiro
Recursos Genéticos e
Biotecnologia, Brasília-DF,
Brasil,

autor para correspondência
E-mail:
gbcabral@cenargen.embrapa.br

Efeito de meios de cultura e da pressão osmótica na transformação genética de suspensão celular de *Brachiaria brizantha* (A. Rich.) Stapf (Poaceae) cv. Marandu

1. INTRODUÇÃO

Brachiaria brizantha é uma forrageira amplamente utilizada no Brasil como pastagem, principalmente na pecuária de corte, devendo-se isto à sua boa adaptabilidade a diferentes tipos de solo e à resistência a pragas como a cigarrinha das pastagens [1]. Em *Brachiaria* a grande maioria das espécies descritas se reproduz por apomixia, que é um modo de reprodução assexual no qual ocorre a clonagem através de sementes. O saco embrionário não reduzido se desenvolve a partir de uma célula nucelar somática, ocorrendo o desenvolvimento do embrião sem a fertilização da oosfera. Este tipo de apomixia é denominado de aposporia [2]. O melhoramento genético de espécies do gênero *Brachiaria* é um processo complexo devido aos diferentes níveis de ploidia, pois todos os acessos apomíticos são poliplóides enquanto os sexuais são diplóides [3]. Além disso, ocorre predominância da apomixia, sendo que os apomíticos podem ser usados apenas como progenitores masculinos. No melhoramento genético têm sido empregados tetraplóides artificiais sexuais para favorecer os cruzamentos intra e interespecíficos para geração de variabilidade genética nesta forrageira. A transformação de plantas é uma técnica que tem sido utilizada como ferramenta para o melhoramento genético, e visa ampliar as possibilidades, uma vez que ela permite a transferência de genes isolados de qualquer organismo para o genoma da planta receptora, independente de haver compatibilidade sexual [4]. A biotecnologia tem na apomixia um desafio e tanto, porque uma vez identificados os genes responsáveis por este modo de reprodução, e tendo-se o domínio de método de transformação genética, vários caminhos estarão abertos, desde o entendimento dos modos de reprodução sexual e apomítico, como a possibilidade de reprodução clonal por sementes de diferentes plantas. Isto é de grande interesse para a fixação de híbridos. Um método de transformação de plantas bastante utilizado é a biobalística [5]. Esta técnica foi desenvolvida para *B. ruziziensis* [6] e tem sido desenvolvida para *B. brizantha* [7, 8, 9, 10].

Os objetivos deste trabalho foram: (1) testar 2 métodos para indução e regeneração de suspensão celular usando a combinação de meios

MSCLind/MSCLreg pH 4, que é o método que temos utilizado para braquiária, comparando com a combinação de meios para obtenção de plantas de arroz (NBind/NBreg) usando pH 4 ou pH 5.8. Nesses experimentos comparou-se também a expressão transiente dos plasmídeos pAHC27 ou pAHUG. (2) Testar o efeito da pressão osmótica

Material e métodos

A. Material Vegetal

Foram utilizadas sementes maduras de *Brachiaria brizantha* cv Marandu (BRA000591), apomítica tetraplóide ($2n = 4X = 32$).

B. Desinfestação das sementes

Após a retirada da pálea e gluma, as sementes foram desinfestadas em álcool comercial diluído a 70% por cinco minutos, e hipoclorito de sódio 5% por 25 minutos; e depois foram lavadas três vezes com água destilada esterilizada.

C. Indução de calos embriogênicos

Após desinfestação, as sementes foram inoculadas em meio de indução de calos MSCLind (Sais e vitaminas MS – [11]- caseína hidrolisada 300 mg/L, sacarose 3%, ágar 1,3% suplementado com BAP – benzilaminopurina - 0,2mg/L e 2,4-D -ácido 2,4-diclorofenoxiacético - 3mg/L), pH 4 ou NB (Sais N6 e vitaminas B5 – inositol 100mg/L, prolina e glutamina 500mg/L, caseína hidrolisada 300 mg/L, sacarose 3%, fitagel 0,3% suplementado com ácido 2,4-diclorofenoxiacético – 2,5 mg/L), pH 4 ou 5,8. As sementes foram cultivadas em câmara de crescimento no escuro a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

D. Indução de suspensão celular embriogênica em

na transformação genética e na regeneração de plantas transformadas usando SC de *B. brizantha* induzidas em meio MSCLind e bombardeadas com os plasmídeos pAHC27 ou pAHUG. Temos tentado obter um método para através de suspensão celular e biobalística produzir transformantes estáveis de braquiária.

dois meios de cultura

Após 30 dias de cultura, os calos embriogênicos foram transferidos para meios MSCLind Líquido pH 4 ou NB pH 4 ou 5,8 e cultivados no escuro sob agitação orbital de 100rpm durante duas semanas, sendo que a cada 7 dias os meios foram trocados. Após esse período, o material foi separado por decantação, conservando-se apenas a suspensão celular (SC), e sendo descartados os calos e material diferenciado. Esta suspensão permaneceu em cultura sob agitação por mais uma semana.

E. Pressão osmótica nas SC 24 horas antes e depois do bombardeamento

Depois de uma semana de cultura pós-decantação, as SC foram plaqueadas em meios de bombardeamento (MSCLind pH 4 fitagel 0,7%) com sacarose 3% ou 12%, onde permaneceram por 24 horas antes e depois do bombardeamento. Cinquenta placas de SC foram bombardeadas com pAHUG e pAHC27 em 3 experimentos.

E. Biobalística

Foram usados os plasmídeos pAHC27 ou pAHUG, ambos contendo o gene *gus* dirigido pelo promotor pUbi1 de milho [12]. O pAHUG contém também o gene de seleção *hpt* que confere resistência ao antibiótico higromicina.

As condições físicas do bombardeamento foram:

pressão de gás Hélio 900 PSI, distância do anteparo para o explante de 6 cm e vácuo de 25 lb de Hg. Foram ainda usados 10 μ g de DNA/tiro, partículas de tungstênio M10 e foi dado um

Resultados e Discussão

Efeito de diferentes meios na Indução de embriogênese e na expressão do gene *gus*

Calos embriogênicos obtidos nos meios de cultura testados apresentaram diferentes taxas de indução como apresentado na Tabela 1. Observa-se que no meio NB-Básico pH 5,8 67% de sementes formaram calos embriogênicos, enquanto que no MSCLind pH 4 foi de 41%. Não houve diferença significativa quanto à indução de calos, entre os meios MSCLind e NB-Básico quando em ambos o pH foi 4. Anteriormente, foi observada a influência positiva do pH 4 na indução e regeneração de SC de *B. brizantha* nos meios MSCLind/MSCLreg quando comparado com o pH 5,8 [10]. No processo de transformação genética é necessário avaliar as condições que favorecem a indução de calos embriogênicos, a regeneração, assim como a transformação das células vegetais. Assim sendo, comparamos a expressão do gene *gus* em suspensões celulares obtidas de calos embriogênicos nos meios MSCLind ou NBind, tendo sido maior a expressão transiente do gene *gus* nas SC obtidas no meio NB do que no meio MSCL. Conciliando os resultados de indução e expressão pode-se

tiro/placa.

F. Detecção histoquímica do gene *gus*

Após 24h uma parte das células de cada placa foi coletada e incubada em solução de X-Gluc [13].

observar que o meio NB pH 5.8 mostrou-se mais promissor. Os experimentos estão em andamento para elucidar a resposta das suspensões celulares quanto à regeneração e expressão estável do gene marcador *gus* nas plantas obtidas.

Efeito da pressão osmótica nas Suspensões Celulares

A Tabela 2 mostra o efeito positivo do aumento da expressão do gene *gus* quando as SC foram submetidas a 12% de sacarose por 24h antes e após o bombardeamento quando foi usado o plasmídeo pAHC27. Este aumento da expressão pode ser devido à plasmólise, o que pode ocasionar maior exposição dos núcleos das células, favorecendo a maior introdução de DNA exógeno. O pAHUG não foi eficiente em nenhuma das condições testadas. Em células embriogênicas de várias monocotiledôneas como milho [13], *Paspalum notatum* [14] e *Pennisetum glaucum* [15] o tratamento osmótico antes e após o bombardeamento tem sido importante para o sucesso da transformação genética. Os experimentos estão em andamento e futuramente será avaliada a regeneração das plantas e a expressão estável do gene *gus* nas mesmas.

Tabela 1: Efeito de diferentes meios de cultura e seus pH na indução de calos embriogênicos, e na expressão transiente do gene *gus*, comparando os plasmídeos pAHUG e pAHC27. Média de 2 experimentos.

<i>Meio de cultura</i>	<i>Nº total de sementes</i>	<i>Nº de calos embriogênicos</i>	<i>% de calos embriogênicos</i>	<i>Número de pontos azuis</i>	
				<i>pAHUG</i>	<i>pAHC27</i>
MSCLind pH 4	160	65	41	5	4
NB-Básico pH 4	50	23	46	0	18
NB-Básico pH 5,8	90	60	67	10	12,5

Tabela 2: Efeito da pressão osmótica 24 horas antes e depois do bombardeamento na expressão transiente do gene *gus* em suspensões celulares comparando os plasmídeos pAHUG e pAHC27.

<i>Experimento</i>	<i>Nº total de placas bombardeadas</i>	<i>Nº pontos azuis em 3% sacarose</i>		<i>Nº pontos azuis em 12% sacarose</i>	
		<i>pAHUG</i>	<i>pAHC27</i>	<i>pAHUG</i>	<i>pAHC27</i>
1	26	0	4	1	40
2	8	0	0	0	0
3	18	1	1	0	20

Referências

- LAPOINTE, S. L.; MILES, J. W. 1992. Germplasm case study : *Brachiaria* species. In: Ciat (Ed.). Pastures for the tropical lowlands, Germplasm case study : *Brachiaria* species, p.43-55.
- CARNEIRO, V. T. C. DUSI, D. M. A. Clonagem de plantas por sementes: Estratégias de estudo da apomixia. Brasília-DF: Embrapa. 2004. 92 p.,
- VALLE, C. B. D.; MILES, J. W. 1994. Melhoramento de gramíneas do gênero *Brachiaria*. In: A. M. Peixoto, J. C. D. Moura, *et al* (Ed.). XI Simpósio sobre manejo de pastagem. Piracicaba, SP, Brasil.: FEALQ, v.23, Melhoramento de gramíneas do gênero *Brachiaria*.
- BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V.T.C., 1998. Eds. Manual de Transformação Genética de Plantas. Brasília - DF: EMBRAPA-SPI, v.01, p.309, 1ed.
- SANFORD, J. C.; KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; ALLEN, N. 1987. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. Journal of Particle Science and Technology, v.5, p.27-37.
- LENIS, MANZANO, S. J. 1998. Desenvolvimento de um método de transformação genética de *Brachiaria* spp, por bombardeamento de partículas. (Mestrado em Biologia Molecular). Universidade de Brasília, 131p.
- SILVEIRA, E. D.; RODRIGUES, J. C. M.; CABRAL, G. B.; LEITE, J. A.; COSTA, S. S.; CARNEIRO, V. T. C. 2003. Evaluation of exogenous promoters for use in *Brachiaria brizantha* transformation. Journal of Plant Biotechnology, v.5, n.2, p.87-93.
- SANTANA, C. G., 2006. Regeneração e Transformação Genética de *Brachiaria brizantha* via Biobalística. (Monografia). Ciências Biológicas, Faculdades Integradas da Terra de Brasília - FTB, Brasília 33 p.
- CABRAL, G. B.; SANTANA, C.G.; CARNEIRO, V.T.C.; MATSUMOTO, K. 2006. Ocorrência de Albinismo em embriogênese somática repetitiva em *Brachiaria brizantha*. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Boletim de Pesquisa, 160.

LACERDA, A. L. M. 2007. *Brachiaria brizantha*: Caracterização de cDNA de ovários e identificação de explantes para transformação via biobalística. (Mestrado em Biologia Molecular). Universidade de Brasília, 110p.

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

CHRISTENSEN, A. H.; QUAIL, P. H. 1996. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Research*, v.5, p.213-218.

JEFFERSON, R. A.; KAVANAGH, T. A.; BEVAN, M. W. 1987. GUS fusions: β -glucuronidase as a

sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.*, v.6, n.13, p.3901-3907.

PHILIPPE VAIN, M. D. M.; FINER, J. J 1993. Osmotic treatment enhances particle bombardment – mediated transient and stable transformation of maize. *Plant Cell Reports*, V. 12, n.2, p.84-88.

SMITH, R.; GRANDO, M.; LI, Y.; SEIB, J. ; SHATTERS, R. 2002. Transformation of bahiagrass (*Paspalum notatum Flugge*). *Plant cell Reports*, v.20, n.11, p.1017-1021.

GOLDMAN, J. J.; HANNA, W. W.; FLEMING, G. ; OZIAS-AKINS, P. 2003. Fertile transgenic pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] plants recovered through microprojectile bombardment and phosphinothricin selection of apical meristem-, inflorescence-, and immature-derived embryogenic tissues. *Plant Cell Reports*, v.21, n.10, p.999-1009.

**Circular
Técnica, 57**

**Ministério
da
Agricultura,
Pecuária
e
Abastecimento**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) – Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372
PABX: (61) 3448-4673 Fax: (61) 3340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e-mail: sac@cenargen.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2007):

**Comitê de
Publicações**

Presidente: Sergio Mauro Folle
Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: Arthur da Silva Mariante
Maria da Graça S. P. Negrão
Maria de Fátima Batista
Maurício Machain Franco
Regina Maria Dechechi Carneiro
Sueli Correa Marques de Mello
Vera Tavares de Campos Carneiro

Expediente

Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*

Editoreção eletrônica: *Daniele Alves Loiola*

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

