

**Efeito de meios, pH e tratamento  
osmótico na transformação genética  
de suspensão celular e regeneração  
de plantas de *Brachiaria brizantha* cv.  
Marandu**

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.*

## ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 228***

**Efeito de meios, pH e tratamento  
osmótico na transformação genética  
de suspensão celular e regeneração  
de plantas de *Brachiaria brizantha* cv.  
Marandu**

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) 448-4600 Fax: (61) 340-3624  
<http://www.cenargen.embrapa.br>  
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

**Presidente:** *Miguel Borges*

**Secretária-Executiva:** *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

**Membros:** *Diva Maria de Alencar Dusi*  
*Luiz Adriano Maia Cordeiro*  
*José Roberto de Alencar Moreira*  
*Regina Maria Dechechi G. Carneiro*  
*Samuel Rezende Paiva*

**Suplentes:** *João Batista Tavares da Silva*  
*Margot Alves Nunes Dode*

**Supervisor editorial:** *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

**Normalização Bibliográfica:** *Rosameres Rocha Galvão*

**Editoração eletrônica:** *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

**Figura da Capa. Figuras A-H-** Suspensões celulares bombardeadas com o plasmídeo pAHC27 e cultivadas em meio NB-Básico pH 5,8 (esquerda) e pH 4 (direita): **B-** : Ensaio Histoquímico para o gene *gus* em SC quando cultivadas no meio NB-Básico pH 5.8 (seta azul); **C-** Calos obtidos de SC apresentando oxidação e formação de raízes (seta preta) cultivados em meio MSCLreg pH 4.0; **D** e **E-** Regeneração de brotos a partir de SC bombardeadas, embrião somático germinando (seta preta) e plântulas obtidas do embrião somático mostrado na figura **D**; **F** e **G** Expressão do gene *gus* em plântulas obtidas de SC bombardeadas no meio MSCLreg pH 4, folha (seta preta) e segmento basal de plântula in vitro com meristema apical azul (seta preta); **H-** broto regenerado em meio NB – Básico 5.8 de SC bombardeada . Todas as barras = 1 mm.

1ª edição

1ª impressão (2008):

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

---

E 27 Efeito de meios, pH e tratamento osmótico na transformação genética de suspensão celular e regeneração de plantas de *Brachiaria brizantha* cv Marandu. / L. Oliveira ... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.

- p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340; 228).

1. *Brachiaria brizantha* – Reprodução - Melhoramento. 2. Maradu.  
I. Oliveira, L. II. Série.

633.2 – CDD 21

---

©Embrapa 2008

# Sumário

<b>Resumo .....</b>	<b>5</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>6</b>
<b>Material e Métodos .....</b>	<b>6</b>
<b>Resultados e Discussão .....</b>	<b>9</b>
<b>Conclusão .....</b>	<b>10</b>
<b>Referências .....</b>	<b>10</b>

# **Efeito de meios, pH e tratamento osmótico na transformação genética de suspensão celular e regeneração de plantas de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu**

**L. Oliveira<sup>1</sup>**

**D. M. A. Dusi<sup>2</sup>**

**A. L. M. Lacerda<sup>3</sup>**

**V.T.C. Carneiro<sup>2</sup>**

**G. B. Cabral<sup>2</sup>**

## **Resumo**

*Brachiaria brizantha* é uma forrageira amplamente utilizada na pecuária de corte. Em *Brachiaria* a grande maioria das espécies descritas se reproduz por apomixia, um modo de reprodução assexual. A transformação genética de plantas tem sido utilizada como ferramenta para o melhoramento genético, e visa ampliar as possibilidades, uma vez que permite a transferência de genes isolados de qualquer organismo para o genoma da planta receptora, independentemente da compatibilidade sexual. O objetivo deste trabalho foi testar dois meios de cultura e pH para a indução de suspensão celular, assim como o efeito da pressão osmótica na transformação genética e regeneração de plantas, visando o estabelecimento de um método para obtenção de transformantes. Sementes maduras foram cultivadas em meios MSClind pH 4 ou NB básico pH 4 ou 5,8 e após 30 dias, calos embriogênicos foram transferidos para os respectivos meios líquidos. Depois desse período as suspensões celulares (SC) foram filtradas e permaneceram em cultura sob agitação por mais uma semana, quando foram plaqueadas e bombardeadas em meios com sacarose 3 ou 12%; onde permaneceram por 24 horas antes e depois do bombardeamento, com plasmídios pAHC27 ou pAHUG, ambos contendo o gene *gus* dirigido pelo promotor pUbi1 de milho. Após 24h, uma parte das células foi analisada histoquimicamente para a presença da GUS. Calos embriogênicos obtidos nos meios de cultura testados apresentaram diferentes taxas de indução, não tendo havido diferença significativa entre eles, quando em ambos o pH foi 4. Foi observado o efeito positivo do aumento da expressão do gene *gus* quando as SC foram submetidas a 12% de sacarose no bombardeamento, favorecendo a maior eficiência na transformação, todavia, quando transferidas para meio de regeneração, todas oxidaram, mostrando um efeito deletério da elevada fonte de carbono para a formação de plantas. Foram obtidas plântulas a partir de SC bombardeadas em sacarose 3% e com pAHC27, cultivadas em MSCL pH 4 e NB básico pH5.8, que foram avaliadas por PCR para a presença do gene *gus*.

---

<sup>1</sup> Biologia, graduando, Faculdades Integradas da Terra - FTB

<sup>2</sup> Bióloga, MSc, doutoranda da Universidade de Brasília - UNB

<sup>3</sup> Bióloga, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

## Introdução

*Brachiaria brizantha* é uma forrageira amplamente utilizada no Brasil como pastagem, principalmente na pecuária de corte. Em *Brachiaria* a grande maioria das espécies descritas se reproduz por apomixia, que é um modo de reprodução assexual. 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, independentemente da compatibilidade sexual. O objetivo deste trabalho foi testar dois meios de cultura e pH para a indução de suspensão celular, assim como o efeito da pressão osmótica na transformação genética e regeneração de plantas, visando o estabelecimento de um método de rotina para obtenção de transformantes.

## Material e Métodos

### Material Vegetal

- Plantas de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu apomítica BRA 000591 (B30) e do acesso sexual BRA 002747 (B105) cultivadas no campo da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, e in vitro, em sala de cultura com temperatura de 25°C ± 2°C em fotoperíodo de 16 horas.
- Sementes maduras de *B. brizantha* cv. Marandu apomítica BRA 000591.

### Desinfestação de sementes

As sementes de *B. brizantha* cv. Marandu BRA 000591 (B30) foram descascadas, tendo sido retiradas a pálea e a gluma; e após terem sido selecionadas quanto ao aspecto fisiológico e de sanidade, as sementes foram desinfestadas com álcool comercial 70% por cinco minutos, para a quebra da tensão superficial, e com hipoclorito de sódio 5% durante 25 minutos, com a adição de TWEEN 20 2.5 mL (USB). As sementes foram então lavadas três vezes com água deionizada esterilizada para a eliminação de sais minerais.

### Indução de calos embriogênicos

Após a desinfestação, as sementes do acesso apomítico foram inoculadas em placas de Petri contendo meio MSCLind pH 4 ou NB em pH 4 ou 5.8. As sementes foram cultivadas em câmara de crescimento no escuro a 25 ± 2° C.

### Indução de suspensão celular embriogênica

Calos obtidos a partir de sementes foram selecionados quanto às suas características morfo-anatômicas e transferidos para os meios MSCLind pH 4 ou NB pH 4 ou 5.8 líquido,

que foram mantidos em agitador orbital (LAB-LINE) a 100 rpm no escuro a  $25 \pm 2^\circ \text{C}$  em frasco tipo Erlenmeyer. As culturas foram mantidas durante duas semanas para proliferação da suspensão celular (SC), sendo que a cada sete dias os meios foram trocados. Após esse processo, todo o material de cada Erlenmeyer foi vertido em tubos Falcon de 50 ml para favorecer a decantação, em seguida foi coletada a SC para um novo frasco (Erlenmeyer). Esta suspensão permaneceu em cultura sob agitação por mais uma semana, após a qual foram usadas para o bombardeamento.

### **Transformação Genética via Biobalística**

#### **Preparação e precipitação do DNA nas partículas**

Inicialmente, 60mg de partículas de tungstênio M10 foram pesadas e transferidas para um tubo de microcentrífuga no qual foi acrescentado 1 mL de etanol 70% e mantido em agitador (tipo vortex) em velocidade baixa por cerca de 15 minutos. As micropartículas foram centrifugadas a 12.000 rpm durante cinco minutos, o sobrenadante descartado e adicionado 1 mL de água destilada esterilizada para a lavagem. O processo mais duas vezes

Antes da precipitação do DNA, as partículas de tungstênio foram deixadas em sonificador - durante cinco minutos para a quebra dos grumos através de energia ultra sônica, e por mais 10 minutos em agitador (tipo vortex). Para a precipitação do DNA nas micropartículas foram adicionados, em cada tubo de microcentrífuga (tipo Eppendorf), nesta ordem: 50  $\mu\text{L}$  de partículas, 10  $\mu\text{g}$  de vetor, 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2$  2,5 M e 20  $\mu\text{L}$  de espermidina 0,1 M, sempre sob agitação. Os tubos foram submetidos a agitação por dez minutos em velocidade baixa (agitador tipo Vortex). O material foi centrifugado durante dez segundos, tendo sido retirado o sobrenadante e adicionado 150  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto para ressuspender as partículas. Esta etapa de lavagem foi repetida mais duas vezes. As partículas foram ressuspensas em 24  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto e em cada membrana carreadora foram aplicados 3,2  $\mu\text{L}$ , sendo espalhados no centro da membrana. As membranas carreadoras contendo as partículas com DNA precipitado foram mantidas no dessecador com sílica gel por pelos menos dez minutos ou no máximo por duas horas antes do bombardeamento. Foram usados os plasmídeos pAHC27 (CHRISTENSEN e QUAIL, 1996) ou pAHUG (CABRAL et al., 2003), ambos contendo o gene *gus* dirigido pelo promotor pUbi1 de milho (CHRISTENSEN e QUAIL, 1996). O pAHUG contém também o gene de seleção *hptII* que confere resistência ao antibiótico higromicina.

#### **Efeito da pressão osmótica nas SC 24 horas antes e após o bombardeamento**

As SC foram plaqueadas em meios de bombardeamento (MSCLind pH 4 fitagel 0,7%) ou (NB-Básico pH 4 ou 5.8 fitagel 0.7%) com sacarose 3% - concentração padrão - ou 12%, onde permaneceram durante 24 horas antes do bombardeamento, para que as células

ficassem plasmolizadas. Após o bombardeamento as suspensões celulares foram mantidas nos respectivos meios por 24 h antes do ensaio histoquímico e da transferência para meio líquido.

## Representação esquemática dos plasmídios usados:

### A- plasmídio pAHC27



### B- plasmídio pAHUG



#### Detecção histoquímica da expressão do gene gus

Suspensões celulares foram incubadas em uma solução de X-Gluc ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  100 mM,  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0,5 mM,  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  10 mM, Triton X-100 0,1%, X-Gluc 50 mg/mL 1 mM) por 16 horas a 37°C (JEFFERSON et al., 1987) após permanecerem no vácuo por 5 minutos. Foi observado o resultado em microscópio estereoscópio Zeiss Stemi SV11.

#### Regeneração de plantas a partir de Suspensão celular

As suspensões celulares bombardeadas com o plasmídeo pAHC27 foram transferidas para os meios líquidos MSCLind pH 4 ou NB-Básico pH 4 ou 5.8. As SC bombardeadas com pAHUG foram transferidas para os mesmos meios contendo higromicina 5 mg/L. Nesta etapa de proliferação das células transformadas, as SC foram cultivadas por 2 semanas. Após este período, as SC mantidas em MSCLind foram transferidas para o meio DD1 líquido e após sete dias, transferidas para o meio MSCLreg (sólido) com higromicina a 10 mg/L. No caso das SC cultivadas em NB-básico, na terceira semana estas foram transferidas para o meio de pré-regeneração sólido com 10 mg/L de higromicina, onde foram mantidas no escuro durante 15 dias na sala de cultura em temperatura  $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ$ , após esse período foram transferidos para o meio NB-reg. Quando as plântulas regeneraram foram transferidas para tubos de ensaio para maior oxigenação.

#### PCR das plantas regeneradas

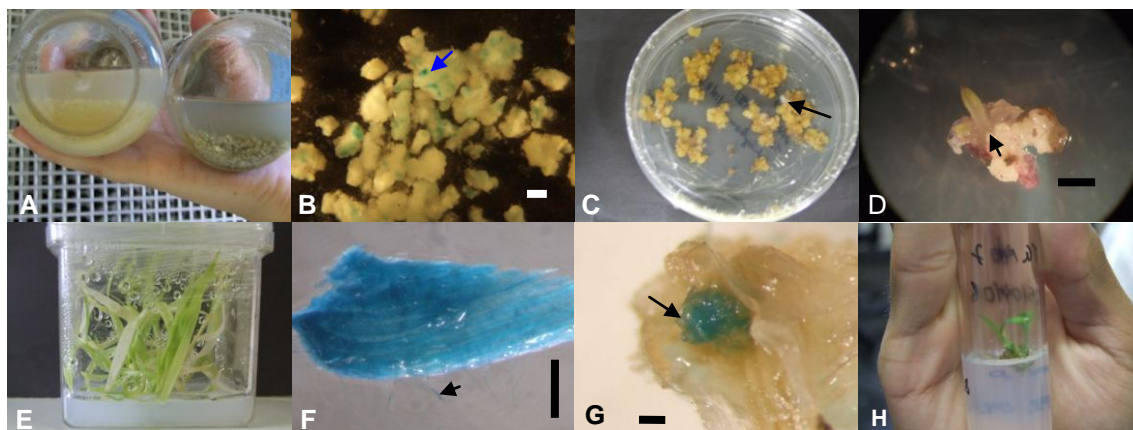
O DNA genômico extraído das plantas regeneradas, foi utilizado para realização de reações de PCR e foram usados primers para o gene *gus* que amplificam um fragmento de 420 pb. Nas reações de PCR foram utilizados 40 ng de DNA genômico, 2,5U de enzima taq Polimerase (Pht), 0,2 mM de primers, 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,13 mM de dNTPs, 1x de tampão de PCR (Pht) e  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ esterilizada para completar um volume final de 50  $\mu\text{L}$ . O



controle negativo da reação consistiu de uma amostra contendo água e o controle positivo conteve o DNA do pAHC27. As condições utilizadas no programa de amplificação foram: desnaturação a 95°C por 5 min, 35 ciclos de 95°C por 1 min, 55°C por 1 min e 73°C por 1 min e extensão final a 73°C por 7 min. O produto final da PCR foi observado em gel de agarose 1% e corado com brometo de etídio sobre luz ultravioleta no Eagle eye.

## Resultados e Discussão

Calos embriogênicos obtidos nos meios de cultura testados apresentaram diferentes taxas de indução, no entanto, não houve diferença significativa (Tabela1). Foi observado o aumento da expressão do gene *gus* quando as SC foram submetidas a 12% de sacarose, favorecendo a maior eficiência na transformação (Tabela 2). Todavia, quando as SC foram transferidas para meio de regeneração todas oxidaram, mostrando um efeito deletério da elevada concentração de fonte de carbono (Figura C). Foram obtidas plântulas a partir de SC bombardeadas em sacarose 3% e com pAHC27, cultivadas em MSCL pH 4 e NB básico pH 5.8 (Figura E e H), que foram positivas para a presença do gene *gus* por histoquímico (Figura F e G), no entanto, foram negativas por PCR.



**Figuras A-H-** Suspensões celulares bombardeadas com o plasmídeo pAHC27 e cultivadas em meio NB-Básico pH 5,8 (esquerda) e pH 4 (direita): **B-** : Ensaio Histoquímico para o gene *gus* em SC quando cultivadas no meio NB-Básico pH 5.8 (seta azul); **C-** Calos obtidos de SC apresentando oxidação e formação de raízes (seta preta) cultivados em meio MSCLreg pH 4.0; **D e E-** Regeneração de brotos a partir de SC bombardeadas, embrião somático germinando (seta preta) e plântulas obtidas do embrião somático mostrado na figura **D**; **F e G** Expressão do gene *gus* em plântulas obtidas de SC bombardeadas no meio MSCLreg pH 4, folha (seta preta) e segmento basal de plântula in vitro com meristema apical azul (seta preta); **H-** broto regenerado em meio NB - Básico 5.8 de SC bombardeada . Todas as barras = 1 mm.

**Tabela 1:** Efeito da pressão osmótica 24 horas antes e depois do bombardeamento na expressão transiente do gene *gus* em suspensões celulares usando os plasmídios pAHUG ou pAHC27.

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

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

## Conclusão

<b>Meio de cultura</b>	<b>Nº total de sementes</b>	<b>Nº de calos embriogênicos</b>	<b>% de calos embriogênicos</b>	<b>Número de pontos azuis</b>	
				<b>pAHUG</b>	<b>pAHC27</b>
<b>MSCLind pH 4</b>	300	107	35.6	5	<b>4</b>
<b>NB-Básico pH 4</b>	180	63	35	0	<b>18</b>
<b>NB-Básico pH 5,8</b>	<b>270</b>	<b>122</b>	<b>45</b>	<b>10</b>	<b>12,5</b>

As SC apresentaram maior taxa de divisão celular no meio NB pH 5.8 do que no meio MSCLind pH 4.0, sendo possível reduzir o tempo de cultura. O plasmídio pAHC27 foi mais eficiente que o pAHUG. A pressão osmótica com sacarose 12% foi mais eficiente que 3% para a expressão transiente, mas foi deletéria para viabilidade e regeneração das SC (OLIVEIRA, 2008).

## Referências

CABRAL, G. B.; LACERDA, A. L. M.; PIRES, M. V. V.; RODRIGUES, J. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. Expressão do gene *gus* em diferentes explante de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2003. p. 431-431.

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

JEFFERSON, R. A.; KAVANAGH, T. A.; BEVAN, M. W. GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO Journal**, Oxford, GB, v. 6, n. 13, p. 3901-3907, 1987.

OLIVEIRA, L. **Efeito de meios de cultura, pH e pressão osmótica na regeneração e transformação genética de suspensões celulares de *Brachiaria brizantha***. 2008. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Faculdades Integradas da Terra de Brasília, Brasília. p 23 – 29.