

**PROSPECÇÃO DE CEPAS DE AGROBACTERIUM SPP. PARA A
TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE BRAQUIÁRIA**

República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Luis Carlos Guedes Pinto
Presidente

Silvio Crestana
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires
Ernesto Paterniani
Helio Tollini
Marcelo Barbosa Saintive
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Silvio Crestana
Diretor Presidente

José Geraldo Eugênio de França
Kepler Euclides Filho
Tatiana Deane de Abreu Sá
Diretores Executivos

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

José Manuel Cabral de Sousa Dias
Chefe-Geral

Maurício Antônio Lopes
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Isabel de Oliveira Penteado
Chefe-Adjunto de Comunicação e Negócios

Maria do Rosário de Moraes
Chefe-Adjunto de Administração

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 115

**PROSPECÇÃO DE CEPAS DE AGROBACTERIUM SPP. PARA
A TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE BRAQUIÁRIA**

G. B. Cabral

V.T.C. Carneiro

C. G. Santana

J. A. Leite

M.V.V. Pires

D. M. A. Dusi

Brasília, DF
2005

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) 3348-4739 Fax:

(61) 3340-3666 <http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Maria Isabel de Oliveira Penteado*

Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Arthur da Silva Mariante*

Maria Alice Bianchi

Maria de Fátima Batista

Maurício Machain Franco

Regina Maria Dechechi Carneiro

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares de Campos Carneiro

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

Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*

Editoração eletrônica: *Maria da Graça S. P. Negrão*

1ª edição

1ª impressão (2005):

P 966 Prospecção de cepas de *Agrobacterium spp.* para a transformação genética de *Braquiária* / G. B. Cabral ... [et al.]. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005.

16 p. – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676 – 1340; 115)

1. *Brachiaria* - transformação genética – biobalística. 2. *Brachiaria* - sistema *Agrobacterium*. 3. *Brachiaria* – planta transgênica. I. Cabral, G. B. II. Série.

571.9648 – CDD 21.

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	8
INTRODUÇÃO	9
MATERIAL E MÉTODOS	10
<i>TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE A AGROBACTERIUM</i>	10
<i>CO-CULTURA</i>	11
RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
<i>TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE</i>	14
<i>CO-CULTURA</i>	15
CONCLUSÃO	16
Referências bibliográficas.....	17

PROSPECÇÃO DE CEPAS DE AGROBACTERIUM SPP. PARA A TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE BRAQUIÁRIA

G. B. Cabral¹

V.T.C. Carneiro²

C. G. Santana³

J. A. Leite⁴

M.V.V. Pires⁵

D. M. A. Dusi⁶

RESUMO

A transformação genética de plantas tem sido utilizada tanto para a ampliação dos limites da disponibilidade de genes para o melhoramento genético quanto para o estudo da função de genes. A Embrapa desenvolveu uma metodologia de transformação genética de *Brachiaria* via biobalística e está trabalhando em sua otimização. Visando maior eficiência de obtenção de plantas transgênicas de *Brachiaria*, a avaliação do potencial de utilização do sistema *Agrobacterium* foi realizada neste trabalho. Para determinação da melhor combinação *Agrobacterium*-braquiária foram feitos testes de susceptibilidade de quatro genótipos de *Brachiaria* sp. cultivados in vitro, com seis linhagens selvagens de *Agrobacterium tumefaciens* e cinco linhagens selvagens de *Agrobacterium rhizogenes*. Embriões isolados de sementes maduras de *Brachiaria brizantha* acesso apomítico e segmentos basais de plantas cultivadas in vitro do acesso sexual foram co-cultivados com diferentes cepas de *Agrobacterium*, e numa outra estratégia, calos embriogênicos a partir de sementes maduras ou segmentos basais foram utilizados para co-cultivo com diferentes cepas. Desta

¹ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

² Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

³ Faculdade da Terra de Brasília

⁴ Universidade de Brasília

⁵ Universidade de Brasília

⁶ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

forma, a susceptibilidade de braquiária a diferentes cepas selvagens de *Agrobacterium* sp foi testada, assim como, a viabilidade do sistema de transformação via *Agrobacterium*, utilizando o vetor pTOK que foi altamente eficiente para monocotiledôneas. Foram obtidos calos e raízes como resultado de co-cultivo com LBA4404 pTOK233 que, no entanto, foram negativo no teste para a expressão de GUS. Os resultados deste trabalho confirmam que o promotor 35SCaMV não é eficiente para braquiária, e indicam novos rumos para os trabalhos de transformação de *Brachiaria*.

ABSTRACT

The genetic transformation of plants has been used for magnifying the limited availability of genes for the genetic breeding and for studying genes function. Embrapa has developed a methodology of genetic transformation of *Brachiaria* by biolistic and has been working in its optimization. Aiming a very efficient protocol to obtain transgenic plants of *Brachiaria*, the evaluation of the potential use of the *Agrobacterium* system was carried through in this work. For determining the best *Agrobacterium-Brachiaria* combination, susceptibility tests were carried out using four in vitro cultivated genotypes of *Brachiaria* sp. with six wild strains of *Agrobacterium tumefaciens* or five wild strains of *Agrobacterium rhizogenes*. Isolated embryos of mature seeds of *Brachiaria brizantha* apomictic access and basal segments of in vitro cultivated plants of the sexual access were co-cultivated with different disarmed strains of *Agrobacterium*, and in another strategy, embryogenic calli from mature seeds or basal segments had been used for co-culture with different strains. In this way, the susceptibility of *Brachiaria* to different wild strains of *Agrobacterium* sp was tested, as well as, the viability of the transformation system via *Agrobacterium* using the pTOK vector, that has been reported as highly efficient for monocots. Some roots were obtained in hygromycin resistant calli resulted from co-culture with LBA4404pTOK233 that, however, had been negative in the histochemical test for the GUS expression. The results of this work confirm that the 35SCaMV promoter is not efficient for *Brachiaria* and indicate new routes for the works in *Brachiaria* genetic transformation.

INTRODUÇÃO

A transformação genética de plantas tem sido utilizada para ampliação dos limites da disponibilidade de genes para o melhoramento genético. No caso de braquiária, as diferenças no nível de ploidia dos acessos apomítico (tetraplóides) e sexual (diplóides) de uma mesma espécie, inviabilizam a obtenção de híbridos intra-específicos por técnicas de hibridação. Além desta barreira, a presença da apomixia, modo de reprodução assexual por sementes, dificulta a geração de variabilidade genética, uma vez que as plantas formadas são idênticas à planta-mãe.

A Embrapa desenvolveu uma metodologia de transformação genética de braquiária, via biobalística, na qual embriões maduros são bombardeados com um plasmídeo contendo genes repórter e de seleção (LENTINI et al, 1999).

Entretanto, para ser utilizada com finalidade de suporte em melhoramento, gerando plantas transgênicas estáveis com alta eficiência, todo o processo necessita ser otimizado. Atualmente, existe também uma grande demanda de utilização da estratégia de genética reversa para a caracterização molecular da apomixia visando o entendimento da função de genes diferencialmente expressos em ovários de planta apomítica e sexual de braquiária (RODRIGUES et al, 2003).

Na genética reversa um gene é silenciado de forma que o seu efeito ou a perda de efeito no organismo possa ser observado e analisado. A estratégia de silenciamento de gene induzido por RNA tem sido usada de forma rotineira em plantas-modelo como *Arabidopsis* e tabaco, e tem elucidado a função de diversos genes. Para tal, a técnica de RNA interferente pode ser utilizada para se induzir o silenciamento dos genes que codificam para os ESTs, levando à perda da função dos mesmos. Neste caso, assim como para o melhoramento genético é necessário um sistema de transformação bastante eficiente e rotineiro. A disponibilidade de promotores eficientes para expressão de genes nas monocotiledôneas tem crescido.

Em testes de expressão transiente em braquiária, dois promotores pAct1 de arroz (MCELROY et al, 1990) e pUbi1 de milho (CHRISTENSEN e QUAIL, 1996) foram identificados como mais eficientes do que o p35SCaMV (DATLA et al,

1991), utilizado na metodologia original de transformação de braquiária por biobalística (SILVEIRA et al, 2003). Com a finalidade de gerar alternativas para a obtenção eficiente de plantas transgênicas, abrindo perspectivas para o estudo da reprodução apomítica e para o melhoramento de braquiária, a avaliação do potencial de utilização do sistema *Agrobacterium* foi realizada neste trabalho. Os resultados obtidos com cepas de *Agrobacterium* confirmam a baixa eficiência do promotor 35SCaMV demonstrada por biobalística (SILVEIRA et al, 2003), para expressão de genes em braquiária.

Assim, também na relação *Agrobacterium*-braquiária existe a indicação da utilização de promotores de maior eficiência, como aqueles de monocotiledôneas Act1 e Ubi1 para a avaliação da relação *Agrobacterium*-hospedeiro, assim como, a utilização de diferentes fatores ambientais, como redução de cálcio, uso de osmóticos e uso de moléculas-sinal para viabilizar/aumentar a interação *Agrobacterium*-hospedeiro durante a co-cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE A AGROBACTERIUM

Material Vegetal

Plantas cultivadas in vitro de *Brachiaria brizantha* sexual (acesso BRA 002747) e apomítica (BRA 000591) e *Brachiaria decumbens* apomítica (BRA 000191) e sexual (BRA 00430) (CABRAL et al, 2003).

Linhagens selvagens de Agrobacterium tumefaciens cepas Ach5, A281, Bo542, B6, 82139 e C58, e *Agrobacterium rhizogenes* cepas A4, LBA9402, R1601, 2659 e 8196. Todas as cepas foram obtidas da coleção da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Inoculação das linhagens selvagens

Uma colônia isolada de cada linhagem foi coletada, de cultura estriada em placa de Petri, e inoculada em meio Luria Bertani (LB) líquido a 26°C, sob agitação

de 200 rpm por 16h, ou até a cultura bacteriana atingir uma Absorbância (600nm) de 0,8. As plantas cultivadas in vitro foram retiradas, uma a uma, do tubo de ensaio e colocadas no papel de filtro para inoculação com a bactéria. A inoculação foi feita ferindo-se a base ou os colmos da planta com uma seringa estéril contendo a cultura bacteriana. Para cada linhagem de bactéria foram inoculadas 4 plantas do acesso apomítico e 4 do acesso sexual, que voltaram a ser cultivadas in vitro (meios Tabela 1) sob fotoperíodo de 16h a 25±2°C por dois meses. O controle consistiu de 3 plantas de cada acesso inoculadas com meio líquido LB, como descrito acima.

CO-CULTURA

Material vegetal

Foram utilizados para co-cultura cinco tipos de explantes: (1) sementes maduras de *Brachiaria brizantha* acesso apomítico (BRA 000591) com embriões expostos, (2) embriões isolados de sementes maduras e (3) segmentos basais de plantas cultivadas in vitro do acesso sexual (BRA 002747) logo após a sua excisão (CABRAL et al, 2003). (4) Calos embriogênicos de embriões ou de sementes maduras, ou ainda (5) calos embriogênicos de segmentos basais, foram cultivados em meios de indução de embriogênese somática M1, M1.2 ou MSC Lind (Tabela 2) e utilizados para co-cultura.

Linhagens desarmadas de Agrobacterium tumefaciens

EHA105pCAMBIA1301, EHA105pCAMBIA1201, GV3101pCAMBIA1301, GV3101pCAMBIA2301, GV3101pCAMBIA3301, LBA4404pCAMBIA1301, LBA4404pCAMBIA2301, LBA4404pCAMBIA3301 e LBA4404pTOK233, obtidas da coleção da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Co-cultura

Uma colônia de bactérias isolada e recém crescida de cada linhagem foi inoculada em 20 mL de meio LB líquido contendo os antibióticos apropriados (50mg/L de rifampicina e 50mg/L de canamicina para a EHA105; 50mg/L de

rifampicina, 300mg/L de estreptomicina, 100 mg/L de canamicina para a LBA4404 e 50mg/L de rifampicina, 50mg/L de canamicina e 50mg/L de gentamicina para a GV3101) e cultivadas a 200 rpm, a 26°C por 16 horas, ou até a cultura atingir uma Absorbância (600nm) de 0,5. A suspensão bacteriana foi centrifugada a 5.000 rpm durante 5 minutos, e as bactérias foram ressuspensas em meio MSC Lind contendo 100 µM de acetoseringona (AS). Calos embriogênicos oriundos de sementes, de embriões ou de segmentos basais, ou ainda segmentos basais excisados “de novo” foram submersos na suspensão bacteriana, a qual foi submetida à sonicação por 30 segundos, e transferidos para meio M1, M1.2 ou MSC Lind sólido contendo AS. A co-cultura foi incubada no escuro por 3 dias, a uma temperatura de 25 ± 2°C. Após este período os explantes foram lavados em água estéril com cefotaxima 500mg/L, secos em papel filtro e plaqueados em meio M1, M1.2 ou MSC Lind sólido na presença de cefotaxima 250 mg/L e higromicina 4 mg/L, e cultivados a 25 ± 2°C com fotoperíodo de 16 horas.

Ensaio histoquímico de GUS

Ensaio histoquímico para atividade da Beta-glucuronidase (GUS) foi realizado em todos os explantes (segmentos basais, sementes, embriões e calos) logo após a co-cultura sólida, e após um mês de cultivo, calos e raízes resistentes que sobreviveram na seleção com higromicina foram submetidos ao teste histoquímico.

Construção de vetor binário pCAMBIA1300AHUG

O pAHUG foi utilizado para a construção do vetor binário de *Agrobacterium* para a co-cultura com calos ou suspensão de células embriogênicas. Primeiro foi feita a digestão do plasmídeo com *Xba*I e *Hind*III que liberou entre outros, um fragmento de 6.843 pb contendo pAct1-*hptII* e pUbi-*gus* que foi purificado do gel e checado por digestão com *Hind*III onde se obteve dois fragmentos de 2.681 e 4.162 pb. Este fragmento foi então clonado em sítio de *Xba*I e *Hind*III do vetor

pCAMBIA1300 cuja região codante do gene de resistência para higromicina (R) foi previamente retirada por digestão com *Xho*I.

Tabela 1: Meios de cultura utilizados para micropropagação e manutenção das plantas de braquiária in vitro.

<u>Meios de Cultura</u>			
<u>Componentes</u>	<u>LS</u>	<u>MMP</u>	<u>B modificado</u>
Sais	MS (Murashige & Skoog, 1962)	MS (1/2X Macro)	MS
Vitaminas	-	MS	Morel
Caseína hidrolisada	100 mg/L	100 mg/L	-
Inositol	100 mg/L	-	-
Tiamina	100 mg/L	-	-
ANA	1 mg/L	0,2 mg/L	-
Cinetina	3 mg/L	0,5 mg/L	-
GA ₃	-	0,2 mg/L	-
BAP	3 mg/L	-	-
Sacarose	30 g	20 g	30 g
Agar	7 g/L	7 g/L	7 g/L
pH 5,8			

Tabela 2: Meios de cultura utilizados para indução de embriogênese somática de braquiária.

Meio de cultura	M1	M1.2	<u>MSCL^{ind}</u>
Componentes			
Sais	MS	MS	MS
Vitaminas	MS	MS	MS
Caseína hidrolisada	100 mg/L	100 mg/L	300 mg/L
BAP	0,2 mg/L	0,2 mg/L	0,2 mg/L
2,4 D	2 mg/L	4 mg/L	3 mg/L
Sacarose	30 g	30 g	30 g/L
Agar	7 g/L	7 g/L	7g
PH	5.8	5.8	5.8

RESULTADOS E DISCUSSÃO

TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE

Periodicamente as plantas inoculadas tanto com *A. tumefaciens* (seis cepas) como aquelas inoculadas com *A. rhizogenes* (cinco cepas) eram observadas, e após 2 meses constatou-se a ausência de tumores e raízes nos sítios de inoculação. No entanto, no local da inoculação foram observadas multibrotações em algumas plantas em todas as combinações genótipo X cepa aproximadamente 15 dias após a inoculação. Essas multibrotações estavam presentes também nas plantas-controle (figura 1), indicando que esta resposta foi induzida pelo ferimento feito com a seringa na região de inoculação no colmo, estimulando a região de gemas adventícias, e não devido à infecção pela bactéria. Apesar das multibrotações terem sido independentes da infecção, esta resposta poderá ser valiosa quando da obtenção de cepas que se mostrem efetivas na infecção e transformação de braquiária. É possível que células transformadas desta região tenham capacidade de gerar plantas transgênicas diretamente.

Construção do vetor binário

O pAHUG foi utilizado para a construção do vetor binário de *Agrobacterium* pCAMBIA1300AHUG (figura 2) para a co-cultura com calos ou suspensão de células embriogênicas. O plasmídeo resultante deverá ser introduzido nas cepas, LBA4404, AGL1 e EHA105, consideradas mais virulentas para monocotiledôneas, como milho (ZHAO et al, 2001); trigo (AMOAH et al, 2001) cevada (MURRAY et al, 2004) e arroz (HIEI et al, 1994).

CO-CULTURA

Após um mês de cultivo na presença de higromicina, todos os calos embriogênicos apresentaram-se oxidados. No entanto, o tratamento no qual os calos foram induzidos no meio M1.2 e co-cultivados com a LBA4404 pTOK233 apresentou dezoito calos com raízes (36% dos calos co-cultivados) (Figura 3). Essas raízes, assim como alguns calos menos oxidados foram submetidos ao ensaio histoquímico para verificar a atividade da GUS, tendo dado resultado negativo. Em nenhuma das combinações genótipo X cepa X tipo de explante foi possível observar a expressão do gene *gus* nos ensaios histoquímicos realizados após a co-cultura ou após um mês de cultivo.

Nossos resultados de co-cultura foram obtidos utilizando agrobactérias que carregam vetores binários que contêm o promotor p35SCaMV dirigindo a expressão do gene *gus* como a do gene de seleção (*hph*). Estes resultados não são conclusivos quanto a haver ou não interação favorável *Agrobacterium*-braquiária, uma vez que estudos de expressão transiente, realizados em nosso laboratório, indicaram que o promotor constitutivo p35SCaMV não é eficiente para braquiária (SILVEIRA et al, 2003). Ainda que esteja ocorrendo interação entre a *Agrobacterium* e a célula de braquiária, pode não estar havendo a expressão dos genes, devido ao promotor utilizado. Dois promotores pAct1 de arroz (MCELROY et al, 1990) e pUbi de milho (CHRISTENSEN e QUAIL, 1996) foram identificados como mais eficientes do que o p35SCaMV para braquiária (SILVEIRA et al, 2003), e baseado num vetor para transformação direta, o pAHUG, um vetor binário contendo esses promotores dirigindo a expressão do gene *hptII* e o gene *gus* será

introduzido e testado em diferentes cepas para que essas questões sejam esclarecidas.

Na relação *Agrobacterium*-braquiária existe a necessidade de utilização de promotores de maior eficiência, como foi demonstrado neste trabalho, assim como, a utilização de diferentes fatores ambientais durante a co-cultura, como redução de cálcio, uso de osmóticos e uso de moléculas-sinal para viabilizar/aumentar a interação *Agrobacterium*-hospedeiro. Estes fatores têm sido utilizados para obtenção de plantas transgênicas de diversas monocotiledôneas consideradas anteriormente recalcitrantes pelo sistema *Agrobacterium* (MURRAY et al, 2004), trigo (AMOAHA et al, 2001), milho (ISHIDA et al, 1996) e arroz (HIEI et al, 1994).

CONCLUSÃO

O teste de susceptibilidade dos acessos apomítico e sexual de *B. brizantha* e *decumbens*, testadas contra linhagens selvagens de *Agrobacterium tumefaciens* e *rhizogenes*, foi negativo para a formação de tumores e/ou raízes, não implicando na impossibilidade de em condições de co-cultura ocorrer o processo de transferência de genes da Agrobactéria para células de braquiária. Um vetor binário (pCAMBIA1300AHUG) para transformação genética de monocotiledôneas será introduzido em diferentes cepas de *Agrobacterium*. O promotor p35SCAMV não é eficiente para promover a expressão do gene *gus* em células de braquiária de diferentes explantes testados. A perspectiva atual é a utilização do vetor pCAMBIA1300AHUG que tem promotores de monocotiledôneas e que expressam em braquiária, conjuntamente com diferentes fatores ambientais da co-cultura acima citados para promover a transferência gênica entre *Agrobacterium* e braquiária e sua expressão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AMOAH, B. K.; WU, H.; SPARKS, C.; JONES, H. D. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of *uidA* in wheat inflorescence tissue. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, GB, v. 52, n. 358, p. 1135-1142, 2001.

CABRAL, G. B.; PIRES, M. V. V.; LACERDA, A. L.; CARNEIRO, V. T. de C. **Introdução in vitro, micropropagação e conservação de plantas de *Brachiaria* sp.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico, 101). p. 1-4. URL/URI: <http://www.cenargen.embrapa.br/publica/trabalhos/cot101.pdf>

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

DATLA, R. S.; HAMMERLINDT, J. K.; PELCHER, L. E.; CROSBY, W. L.; SELVARAJ, G. A bifunctional fusion between beta-glucuronidase and neomycin phosphotransferase: a broad-spectrum marker enzyme for plants. **Gene**, Amsterdam, v. 101, p. 239-246, 1991.

HIEI, Y.; OHTA, S.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. **The Plant Journal**, Oxford, GB, v. 6, p. 271-282, 1994.

ISHIDA, Y.; SAITO, H.; OHTA, S.; HIEI, Y.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature Biotechnology**, New York, v. 14, p. 745-751, 1996.

LENTINI, Z.; CARNEIRO, V. T. C.; MANZANO, S. J. L.; GALINDO, L. **Processo de regeneração de plantas e transformação genética de espécies de *Brachiaria***. Colômbia: CIAT; Brasília: EMBRAPA, 1999. PI 9903700-9.

MCELROY, D.; ZHANG, W.; CAO, J.; WU, R. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. **Plant Cell**, Rockville, US, v. 2, p. 163-171, 1990.

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

MURRAY, F.; BRETTELL, R.; MATTHEWS, P.; BISHOP, D.; JACOBSEN, J. Comparison of *Agrobacterium*-mediated transformation of four barley cultivars using the GFP and GUS reporter genes. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 22, p. 397-402, 2004.

RODRIGUES, J. C. M.; CABRAL, G. B.; DUSI, D. M. A.; MELLO, L. V.; RIGDEN, D.; CARNEIRO, V. T. C. Identification of differentially expressed cDNA sequences in ovaries of sexual and apomictic plants of *Brachiaria brizantha*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, NL, v. 53, p. 745-757, 2003.

SILVEIRA, E. D.; RODRIGUES, J. C. M.; CABRAL, G. B.; LEITE, J. A.; COSTA, S. S.; CARNEIRO, V. T. C. Evaluation of exogenous promoters for use in *Brachiaria brizantha* transformation. **Journal of Plant Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 87-93, 2003.

ZHAO, Z.; GU, W.; CAI, T.; TAGLIANI, L.; HONDRED, D.; BOND, D.; SCHROEDER, S.; RUDERT, M.; PIERCE, D. High throughput genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in maize. **Molecular Breeding**, Dordrecht, NL, v. 8, p. 323-333, 2001.

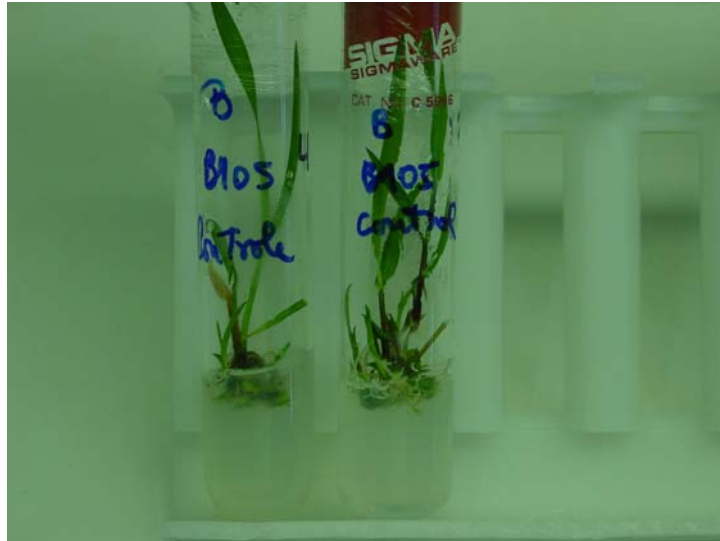
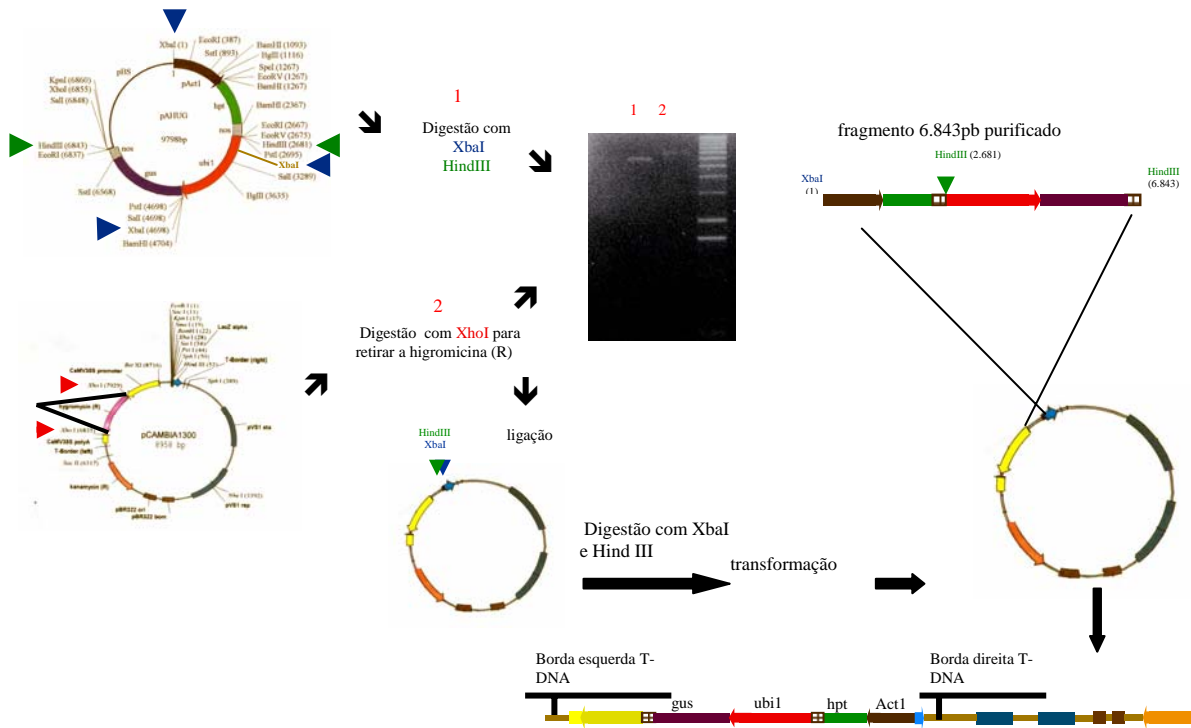


Figura 1: Acesso B105 com multibrotações nas plantas-controle, comprovando o efeito da injúria estimulando a formação dos brotos.



Vetor binário para cocultura

Figura 2: Representação esquemática da construção do vetor binário para transformação de braquiária via *Agrobacterium*.

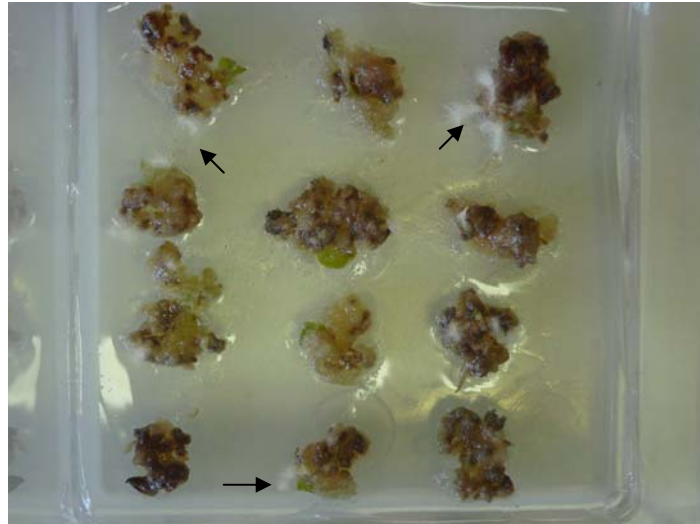


Figura 3: Calos embriogênicos de B30 após a co-cultura com LBA4404pTOK233 cultivados na presença de higromicina apresentando oxidação e produção de algumas raízes (setas) que foram *gus*-negativo.