Comunicado 183
Técnico
ISSN 9192-0099
Dezembro, 2008
Brasília, DF

Efeito de choque térmico em sementes de *Brachiaria brizantha* submetidas à indução de calos embriogênicos para transformação e regeneração de plantas (Effect of heat shock in *Brachiaria brizantha* seeds submitted to embryogenic callus induction for transformation and plant regeneration).

Barbosa, R. P.[1], Oliveira, L.[2]; Carneiro, V. T. C.[3]; Cabral, G. B.[4]

Brachiaria é um gênero de gramíneas proveniente da África e tem sido utilizada como forrageira tropical devido a sua capacidade de adaptação a diferentes tipos de solos e condições climáticas. A apomixia é uma reprodução assexual na qual não ocorre a fusão de gametas, sendo gerados clones da planta-mãe através de sementes viáveis. O presente trabalho teve como objetivo analisar o efeito do choque térmico em sementes maduras induzidas para embriogênese somática e transformação via biobalística. Desta forma, sementes maduras descascadas e selecionadas foram submetidas ao choque térmico a 37ºC por 24h e a 50ºC por 48h, enquanto que as sementes do controle foram diretamente desinfestadas. Em ambos os tratamentos foi feita a desinfestação em etanol 70% por 5 min, e em seguida em hipoclorito de sódio 5% e tween 20 2,5% por 25 min, após o qual foram feitas três lavagens com água deionizada autoclavada. As sementes foram cultivadas em dois meios de cultura sólidos (MSCLind pH 4,0 ou NB-Básico pH 5,8) por um mês na ausência de luz. Após este período, calos embriogênicos foram selecionados e transferidos para os meios líquidos correspondentes. A cada sete dias de cultura os meios foram após sete dias as SC foram plaqueadas em meio de bombardeamento. O vetor utilizado foi o pAHC27 que tem o gene

[1]Biologia, graduanda, Universidade Católica de Brasília – UCB
[2]Biologia, graduando, Faculdades Integradas da Terra - FTB
[3]Bióloga, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
[4]Engenheira Agrônoma, MSc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

gus dirigido pelo promotor de ubiquitina bombardeamento, parte do material foi analisada por ensaio histoquímico e a outra parte foi cultivada por duas semanas nos respectivos meios líquidos. Para favorecer a regeneração, as SC foram transferidas para meio DD1 ou pré-reg respectivamente, onde foram mantidas por uma semana antes de serem plaqueadas em meios de regeneração. Sementes que não sofreram choque térmico tiveram maior porcentagem de formação de calos, e também que os calos obtidos em meio NB-Básico pH 5,8 apresentaram maior diâmetro. As suspensões celulares foram analisadas para seu caráter transgênico.

INTRODUÇÃO

Brachiaria é um gênero de gramíneas proveniente da África e no Brasil tem sido utilizada como forrageira tropical devido a sua capacidade de adaptação a diferentes tipos de solos e condições climáticas, ocupando uma área de 30 a 70 milhões de hectares (MILES et al., 1996). O gênero *Brachiaria* é predominantemente apomítico. A apomixia é uma reprodução assexual na qual não ocorre a fusão de gametas, sendo gerados clones da planta-mãe através de sementes viáveis. O interesse do estudo da apomixia é transferir este tipo de reprodução para outras plantas, visando à fixação do vigor híbrido em culturas de interesse agronômico, como o milho. O presente trabalho teve como objetivo analisar o efeito do tratamento térmico (TT) em

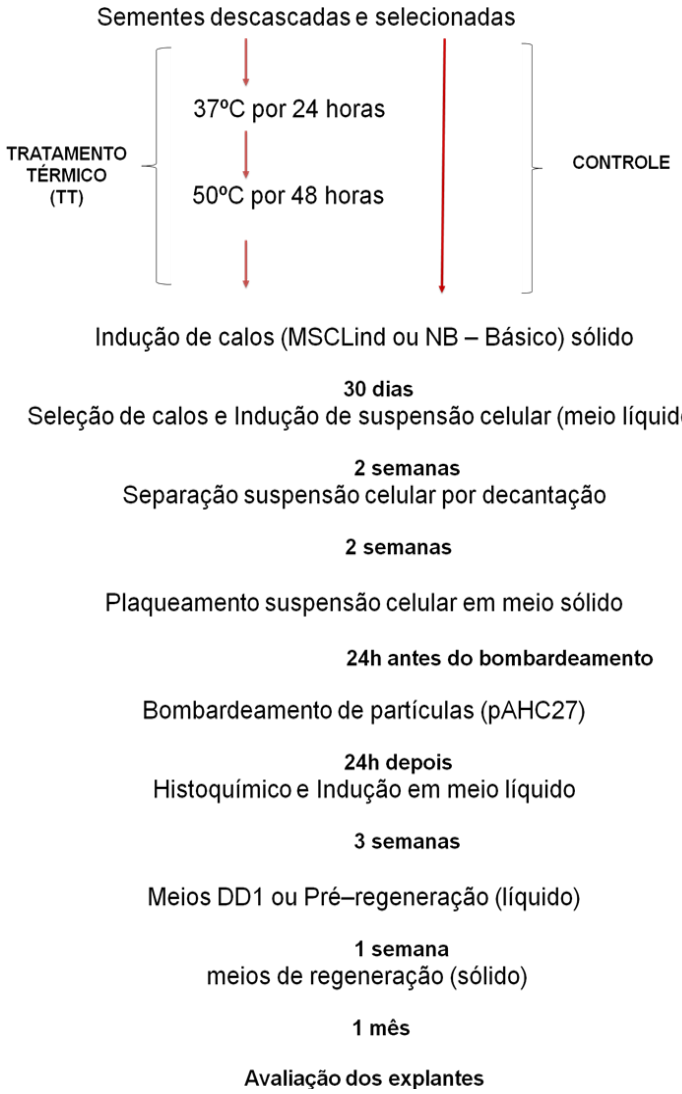
de milho (pUbi1). Após o
sementes maduras submetidas à embriogênese somática e transformação via biobalística.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes maduras descascadas e selecionadas foram submetidas ao choque térmico a 37ºC por 24h e a 50ºC por 48h, enquanto que as sementes do controle foram diretamente desinfestadas. Em ambos os tratamentos foi feita a desinfestação em etanol 70% por 5 min, e em seguida em hipoclorito de sódio 5% e tween 20 2,5% por 25 min, após o qual foram feitas três lavagens com água deionizada autoclavada. As sementes foram cultivadas em dois meios de cultura sólidos (MSCLind pH 4,0 ou NB-Básico pH 5,8) por um mês na ausência de luz. Após este período, calos embriogênicos foram selecionados e transferidos para os meios líquidos correspondentes. A cada sete dias de cultura os meios foram renovados e com duas semanas houve a separação do material diferenciado, ficando apenas a suspensão celular (SC), após sete dias as SC foram plaqueadas em meio de bombardeamento. O vetor utilizado foi o pAHC27 que tem o gene *gus* dirigido pelo promotor de ubiquitina de milho (pUbi1). Após o bombardeamento, parte do material foi analisada por ensaio histoquímico e a outra parte foi cultivada por duas semanas nos respectivos meios líquidos. Para favorecer a regeneração, as SC

foram transferidas para meio DD1 ou pré-reg respectivamente, onde foram mantidas por uma semana antes de serem plaqueadas em meios de regeneração.

Representaçâo Esquemática da Metodologia



RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 mostra que o tratamento térmico nas sementes antes da indução causou uma redução na porcentagem de calos formados nos dois meios testados, não tendo afetado o tamanho dos calos formados no escutelo do embrião das sementes. O tratamento térmico não reduziu a contaminação das sementes por microrganismos endógenos (dados não mostrados). As suspensões celulares (SC) obtidas e bombardeadas com o pAHC27 não apresentaram expressão do gene *gus* e *a*pós serem plaqueadas nos respectivos meios estão em processo de regeneração, como mostrado na figura 1.

Tabela 1: Efeito do tratamento térmico em sementes de *Brachiaria brizantha* na indução de calos embriogênicos em meios de cultura MSCLind (pH 4.0) ou NB – Básico (pH 5.8). Média de três experimentos.

	Nº sementes induzidas	Média do diâmetro dos calos (cm)	% calos formados
MSCLind TT	93	0,6	*47*
NB Básico TT	96	0,5	*51*
MSCLind	93	0,6	*69*
NB Básico	93	0,7	*68*

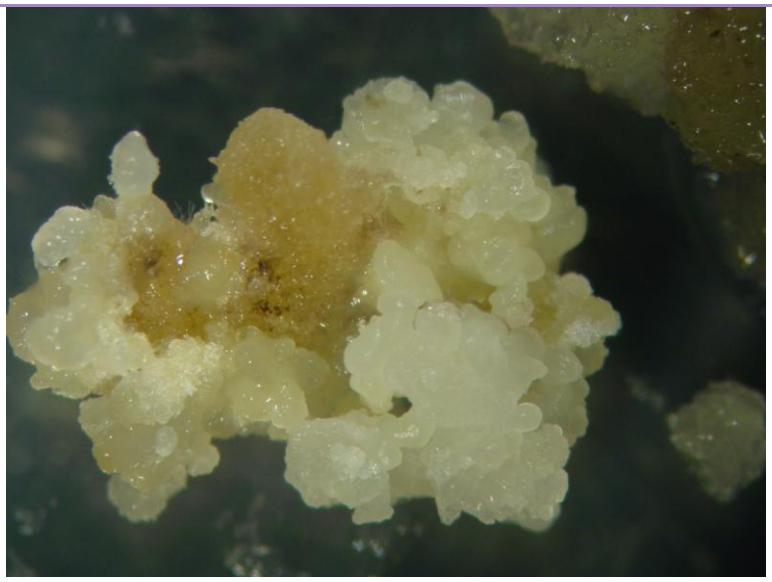


Figura 1: Calo obtido de cpelukas em suspensão (SC) em regenração no meio NB pH 5.8, apresentando formação embriões somáticos

CONCLUSÃO

O tratamento térmico para sementes de *B. brizantha* não foi eficiente para reduzir a contaminação por microrganismos endógenos, nem para estimular a formação de calos embriogênicos, diferentemente do que ocorre com vários genótipos de arroz (SALLAUD et al., 2003). Foi observado um efeito deletério do tratamento térmico nas condições testadas, uma vez que houve redução do número de sementes que formaram calos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. D. (Ed.). **Brachiaria***:* biology, agronomy and improvement. Cali, Colombia: CIAT, 1996. 258 p.

SALLAUD, C. et al. Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa L.)* functional genomics. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 106, p. 1396-1408, 2003.

Comunicado Técnico, 183

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 (2008):

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: *Rosamares Rocha Galvão*
Editoração eletrônica: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento