

Efeito de meios e tratamento osmótico na transformação genética via biobalística de suspensão celular de *Brachiaria brizantha* (A. Rich.) Stapf (Poaceae) cv. Marandu

Glaucia Barbosa Cabral^{1*}, Láynhon de Oliveira², Ana Luiza Machado Lacerda³ e Vera Tavares de Campos Carneiro⁴

Introdução

Brachiaria brizantha é uma forrageira amplamente utilizada no Brasil, principalmente na pecuária de corte, devendo-se isto a 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 na qual ocorre a clonagem através de sementes pela formação de saco embrionário não reduzido, que 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. 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 [2]. Além disso, ocorre predominância da apomixia e nos cruzamentos os apomíticos podem ser usados apenas como progenitores masculinos. No melhoramento genético tem sido empregado tetraplóides artificiais sexuais para favorecer os cruzamentos intra e interespecíficos para explorar a variabilidade genética nessa 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 [3]. A biotecnologia tem na apomixia um desafio e tanto, porque uma vez identificados os genes responsáveis por esse 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 [4]. Esta técnica foi desenvolvida para *B. ruziziensis* [5] e tem sido otimizada para *B. brizantha* [6, 7, 8, 9].

O objetivo deste trabalho foi testar diferentes meios para a indução de suspensão celular e o efeito da pressão osmótica na transformação genética de *B. brizantha*, visando o estabelecimento de um método de rotina para obtenção de transformantes.

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 – [10]-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 - a uma concentração de 3mg/L) e pH 4 ou NB – Básico (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 2,4-D – ácido 2,4 diclorofenoxiacético – a uma concentração de 2,5 mg/L e pH 4 ou 5,8. As sementes foram cultivadas em câmara de crescimento no escuro a $26 \pm 2^\circ\text{C}$.

D. Indução de Suspensão Celular Embriogênica em dois meios de cultura

Após 30 dias de cultura, os calos embriogênicos foram

1. Glaucia Barbosa Cabral é Pesquisador, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, CEP 70.770-900.

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

2. Láynhon de Oliveira é Estudante de Ciências Biológicas, Bolsista da EMBRAPA, Faculdades Integradas da Terra de Brasília, Brasília, DF, CEP

E-mail: laynhon@cenargen.embrapa.br.

3. Ana Luiza Machado Lacerda é Bolsista de DTI do CNPq, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, CEP 70.770-900.

E-mail: analacerda@cenargen.embrapa.br.

4. Vera Tavares de Campos Carneiro é Pesquisador Líder do Projeto, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, CEP 70.770-900.

E-mail: vera@cenargen.embrapa.br.

transferidos para meios MSCLind líquido pH 4 ou NB – Básico pH 4 ou 5,8; e cultivados no escuro sob agitação orbital de 100 rpm durante duas semanas, sendo que a cada 7 dias os meios foram trocados. Após esse período o material foi separado por decantação, ficando 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. Efeito da 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, em concentração de sacarose padrão (3%), ou submetidas à pressão osmótica pela presença deste açúcar em alta dosagem (12%). Vinte e quatro placas de SC foram bombardeadas com pAHUG.

E. Biobalística

Foram usados os plasmídeos pAHC27 ou pAHUG ambos contendo o gene *gus* dirigido pelo promotor pUbi1 de milho [11]. 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 µg de DNA/tiro de partículas de tungstênio M10 e foi dado um tiro/placa.

F. Detecção histoquímica do gene gus

Após 24h uma parte das células de cada placa foi coletada em solução de X-Gluc [12].

Resultados e Discussão

Efeito de diferentes meios na Indução de embriogênese
Calos embriogênicos obtidos nos meios de cultura testados apresentaram diferentes taxas de indução como observado na Tabela 1, na qual o meio NB-Básico pH 5,8 apresenta 67% de sementes que formaram calos embriogênicos, enquanto que no MSCLind pH 4 essa taxa foi de 41%. Não houve diferença significativa 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 [9]. Na Tabela 1 e na Figura 1 pode ser observado o efeito do meio de arroz NB-básico tanto na indução de calos embriogênicos como na expressão do gene *gus*. Experimentos comparando os dois meios nos pH 4 e 5,8 estão em andamento para elucidar a resposta das suspensões celulares a esses meios quanto à indução, regeneração e expressão do gene marcador *gus*.

Efeito da pressão osmótica nas Suspensões Celulares

A Figura 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, tendo ficado plasmolizadas, o que pode ocasionar maior exposição do núcleo, favorecendo a maior eficiência na transformação. 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.

Referências

- [1] 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.
- [2] 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*.
- [3] 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.
- [4] SANFORD, J. C.; KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; ALLEN, N. 1987. Delivery of f substances into cells and tissues using a particle bombardment process. Journal of Particle Science and Technology, v.5, p.27-37.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., v.15, p.473-497.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] GOLDMAN, J. J.; HANNA, W. W.; FLEMING, G. ; OZIAS-AKINS, P. 2003. Fertile transgenic peral 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.

Tabela 1: Efeito de diferentes meios de cultura na indução de calos embriogênicos a partir de sementes maduras de *B. brizantha* cv. Marandu.

Meio de cultura	Nº total de sementes	Nº de calos embriogênicos	% de calos embriogênicos
MSCLind pH 4	160	65	41
NB-Básico pH 4	50	23	46
NB-Básico pH 5,8	90	60	67

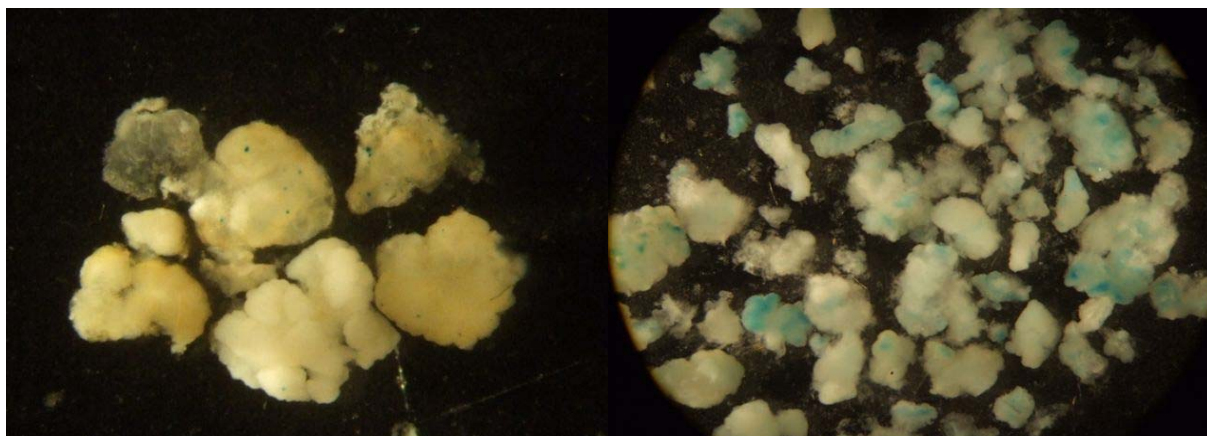


Figura 1: Ensaio histoquímico do gene *gus* em suspensão celular induzida em meio MSCLind pH 4 (esquerda) e NB-Básico pH 5,8 (direita) ambos bombardeados com pAHUG.

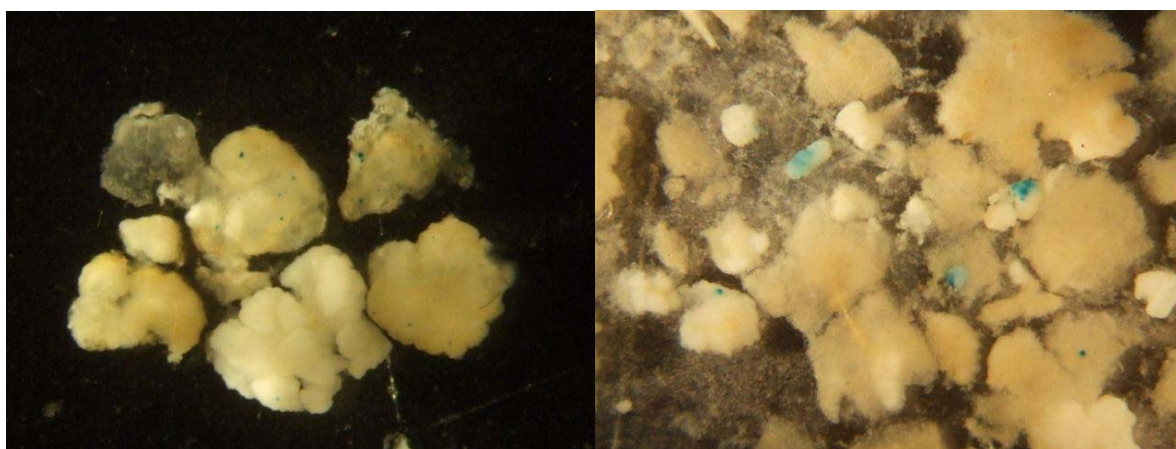


Figura 2: Ensaio histoquímico do gene *gus* em suspensão celular induzida em meio MSCLind pH 4 e submetidas ou não a pressão osmótica, 24h antes do bombardeamento. Meio com 3% de sacarose (esquerda) e 12% (direita) ambos bombardeados com pAHUG.