

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

GLAUCIA BARBOSA CABRAL

**Cultura de tecidos e transformação genética de espécies
da família Poaceae**

Piracicaba

2012

GLAUCIA BARBOSA CABRAL

**Cultura de tecidos e transformação genética de espécies
da família Poaceae**

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientadora: Prof^a Dra. Adriana Pinheiro Martinelli

Piracicaba

2012

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Cabral, Glaucia Barbosa

Cultura de tecidos e transformação genética de espécies da família Poaceae / Glaucia Barbosa Cabral; orientadora Adriana Pinheiro Martinelli. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2012. 158 f.: il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Aceleração de partículas 2. Agrobacterium 3. Arroz 4. Brachiaria 5. Cultura de células vegetais 6. Expressão Gênica 7. Plantas transgênicas I.
Título

CDU 631.52 : 582.542.11

DEDICO

Aos meus amados pais

Socorro e Gerson,

e a minha irmãzinha Glécia

Pelo amor, apoio e confiança incondicionais sempre.

OFEREÇO

*A minha amada filha Ana Clara - minha pequena Cacao
Que do seu jeitinho adoslescente soube entender, ser amiga e
solidária de forma meiga, companheira e inteligente
durante mais esta caminhada juntas. Obrigada minha linda!*

AGRADECIMENTOS

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), pela oportunidade concedida para realização da pós-graduação e pela bolsa de estudos.

À Universidade de São Paulo e ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) pelo aceite para realização do curso.

À minha orientadora, professora Dra. Adriana Pinheiro Martinelli por aceitar o desafio de me orientar à distância, e por toda a sabedoria e apoio neste período.

À Dra. Diva Dusi, da Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia pelo suporte incondicional, ensinamentos ao longo deste trabalho, e também pela amizade.

À Dra. Vera Carneiro, líder do projeto de APOMIXIA do Laboratório de Reprodução Vegetal (LRV) pelos recursos e suporte técnico para realização desta tese.

À Dra. Ana Claudia Guerra Araújo, ao Dr. Júlio Carlyle e a Lilian Hasegawa Florentino, colegas do LRV pelos debates apomíticos calorosos nas reuniões.

Às meninas doutoras do LRV Larissa e Aninha, pela amizade e cumplicidade no laboratório.

À Ana Cristina, do Laboratório de Microscopia do CENARGEN, e à Mônica, do Laboratório de Histopatologia Vegetal do CENA pelo apoio na microscopia. Assim como, ao Laboratório de Microscopia da ESALQ (NAP/MEPA), na pessoa do professor Kitajima, pelo uso dos equipamentos.

Aos colegas vizinhos de laboratório Dr. Francisco Aragão, Elsa, Andréia, e Thaís do LTG pela convivência amigável, troca de reagentes e experiências durante essa caminhada.

Às amigas Lucília e Eliana por sempre estarem prontas a ouvir e compartilhar os momentos difíceis e alegres, muito obrigada meninas! Sem vocês a vida não teria tanto brilho.

À Neuda da CPG-CENA pela atenção e suporte, e a Marília, bibliotecária do CENA, pela confecção da ficha catalográfica e dicas para correções das referências bibliográficas.

À Fernanda, Walmira e Craveiro do SGP-CENARGEN e à Neuza do DGP-SEDE por todo o suporte ao longo desses anos.

A Moacir do setor de compras do cenargen por sempre tentar viabilizar nossas pesquisas.

À toda minha família, meus pais e minha irmã Glecinha (Gré), pelo apoio incondicional, suporte, convívio harmônico e de muita paz, onde sempre recarrego minhas baterias.

À minha filha Cacao, por ser minha fiel escudeira e uma figura muito especial, me apoiando sempre.

À Xaca (Carmen Morales Ruiz) pela inestimável amizade a qualquer momento, pela franqueza das palavras e total suporte durante essa jornada.

Ao meu namorado Reginaldo, que tem feito toda a diferença, me dando todo apoio e sendo meu companheiro e cúmplice em todos os momentos.

À banca examinadora pelo aceite do convite para participar da defesa.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, muito, mas muito obrigada!

RESUMO

CABRAL, G. B. **Cultura de tecidos e transformação genética de espécies da família Poaceae**. 2012. 158f. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

Brachiaria é um gênero de forrageiras da família Poaceae que apresenta plantas que se reproduzem por sementes sexualmente e assexualmente por apomixia. A apomixia desperta interesse biológico e biotecnológico, pela perspectiva de levar esta característica de clonagem de plantas via sementes a outras espécies. As cultivares plantadas de *B. brizantha* cv. Marandu e *B. decumbens* cv. Basilisk são poliplóides e reproduzem-se por apomixia, enquanto as plantas sexuais da mesma espécie são diplóides, dificultando sobremaneira o melhoramento pelo não pareamento dos cromossomos nos cruzamentos. A transformação genética é uma estratégia que vem sendo incorporada aos programas de melhoramento genético. A natureza apomítica dessas plantas pode permitir a clonagem e estabilidade das plantas obtidas através de transformação genética. Para transformação genética é necessário o desenvolvimento de um método eficiente de regeneração *in vitro*. *B. brizantha* é considerada recalcitrante ao cultivo *in vitro*, desta forma, métodos eficientes associados com os sistemas de transformação genética ainda não foram descritos na literatura. O arroz (*Oryza sativa*) é uma Poaceae modelo para estudos de genética reversa, no entanto cultivares tropicais do grupo Japônica são recalcitrantes à transformação genética, como é o caso da cultivar Primavera. O método direto de transformação genética mais amplamente utilizado é a biobalística e vem sendo aplicado em espécies de monocotiledôneas, uma vez que essas não são hospedeiros naturais de *Agrobacterium tumefaciens*. No entanto, vários fatores têm sido testados no sentido de favorecer a interação e transferência de genes durante a cocultura para obtenção de transgênicos em diversas espécies de monocotiledôneas. Os objetivos deste estudo foram obter sistemas de regeneração *in vitro* de *B. brizantha* e de *Oryza sativa* cultivar Primavera para transformação genética destas espécies. Para *B. brizantha* foram obtidos sistema de micropropagação, organogênese, calos embriogênicos, unidades embriogênicas e suspensões celulares e para a cultivar Primavera de arroz foram obtidas unidades

embriogênicas, que foram caracterizadas morfo-anatomicamente e quanto às condições de indução, multiplicação e regeneração *in vitro*. Métodos de expressão transiente e estável de genes marcadores foram estabelecidos para *B. brizantha* via biobalística e *Agrobacterium tumefaciens*. A transgenia foi confirmada por métodos histoquímico e molecular como PCR e *Southern blot*. Os sistemas de regeneração e transformação obtidos mostraram-se eficientes e contribuirão para os estudos da apomixia e introdução de genes de interesse em braquiária.

Palavras-chave: *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. *Oryza sativa* cv. Primavera. embriogênese somática. organogênese. biobalística. *Agrobacterium tumefaciens*. genes marcadores.

ABSTRACT

CABRAL, G. B. **Tissue culture and genetic transformation of Poaceae species.** 2012. 158f. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

Brachiaria is a forage grass belonging to the Poaceae family that reproduces by seeds sexually and asexually through apomixis. Apomixis presents biological and biotechnological interests with the possibility of transferring the capability of cloning through seeds to other species. *B. brizantha* cv. Marandu and *B. decumbens* cv. Basilisk are polyploid reproducing by apomixis, while sexual plants are diploid, greatly hindering genetic improvement due to sexual cross incompatibilities. Genetic transformation is a strategy that has been incorporated into genetic breeding programs. Apomictic plants may be cloned through seeds to maintain the stability of plants obtained by genetic transformation. For genetic transformation it is necessary to develop an efficient method of *in vitro* regeneration. *B. brizantha* is considered recalcitrant to *in vitro* methods, thus efficient methods associated with genetic transformation have not been described in the literature. Rice (*Oryza sativa*) is a Poaceae model species for studies of reverse genetics; however, tropical cultivars of the Japonica group are recalcitrant to genetic transformation, such as the Primavera cultivar. Biolistic is the direct genetic transformation method most widely used, and has been applied to monocot species, since these are not natural hosts of *Agrobacterium tumefaciens*. However, several factors have been tested aiming to promote interaction and gene transfer during coculture for obtaining transgenics in several monocots species. This study aimed to obtain *in vitro* regeneration and genetic transformation systems for *B. brizantha* and *O. sativa*. For *B. brizantha* the results show the development of systems for micropropagation, organogenesis, embryogenic units and embryogenic cell suspensions, and for *O. sativa* cv. Primavera embryogenic units were obtained, which was morpho-anatomically characterized and *in vitro* induction, proliferation and regeneration conditions were established. Methods for transient and stable gene expression have been obtained for *B. brizantha* via biolistic and *Agrobacterium tumefaciens*. The transgenic characteristics the embryogenic callus and plants regenerated was confirmed by histochemical and molecular methods such as PCR and Southern blot. The regeneration and transformation systems showed to be effective and will contribute to apomixis studies and introduction of genes of interest in *B. brizantha*.

Keywords: *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. *Oryza sativa* cv. Primavera. somatic embryogenesis. organogenesis. biolistics. *Agrobacterium tumefaciens*. marker genes.

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D = ácido di-clorofenoxiacético

A₂₆₀ = absorvância a 260 nm

ABA = ácido abscísico

ANA = ácido naftaleno acético

AS = acetoseringona

BAP = 6-benzilaminopurina

BrEt = brometo de etídio

cv. = cultivar

CaMV = vírus do mosaico do couve-flor

CENA = Centro Energia Nuclear para Agricultura

CIN = cinetina

Cx = cefotaxima

DMSO = dimetil sulfóxido

DNA = ácido desoxirribonucléico

dNTP = desoxinucleotídeo trifosfato

EDTA = ácido etileno diamono tetracético

ESD = embrião somático diferenciado com escutelo e eixo embrionário

GA₃ = ácido giberélico

kb = kilo pares de base

Km = canamicina

MS = Murashige e Skoog

p/v = peso/volume

pAct1Os = promotor do gene de actina 1 de *Oryza sativa* (arroz)

PCR = reação em cadeia da polimerase ("polymerase chain reaction")

pH = potencial hidrogeniônico

PSI = unidade de pressão – pound per square inch

pUbi1Zm = promotor do gene de ubiquitina 1 de *Zea mays*(milho)

q.s.p. = quantidade suficiente para

Rf = rifampicina

RNA = ácido ribonucléico

rpm = rotação por minuto

SC = suspensões celulares

SDS = dodecil sulfato de sódio
Sm = estreptomicina
Sp = espectinomicina
TA = temperatura ambiente
Tc = tetraciclina
Tm = timentina
Tris = tris-(hidroximetil)-aminometano
U = unidade de enzima
UE = unidades embriogênicas
USP = Universidade de São Paulo
UV = radiação ultravioleta
VCS = volume celular sedimentado
ZEA = zeatina

LISTA DE SÍMBOLOS

Ø = diâmetro
® = marca comercial registrada
™ = marca comercial não registrada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
3. Capítulo I – Embriogênese somática e organogênese em <i>Brachiaria brizantha</i> apomítica e sexual	
Resumo.....	35
Abstract.....	36
3.1. Introdução	37
3.2. Material e Métodos.....	39
3.3. Resultados e Discussão	43
3.4. Conclusões	57
4. Capítulo II - Regeneração de plantas de <i>Brachiaria brizantha</i> via unidades e suspensões celulares embriogênicas	
Resumo.....	59
Abstract.....	60
4.1. Introdução	61
4.2. Material e Métodos.....	63
4.3. Resultados e Discussão	66
4.4. Conclusões	79
5. Capítulo III – Transformação genética de <i>Brachiaria brizantha</i> via biobalística	
Resumo.....	81
Abstract.....	82
5.1. Introdução	83
5.2. Material e Métodos.....	85
5.3. Resultados e Discussão	92
5.4. Conclusões	109
6. Capítulo IV - Transformação genética de <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu e <i>Oryza sativa</i> cv. Primavera via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	
Resumo.....	111
Abstract.....	112
6.1. Introdução	113
6.2. Material e Métodos.....	116
6.3. Resultados e Discussão	121
6.4. Conclusões	135
7. CONCLUSÕES GERAIS.....	136
REFERÊNCIAS.....	138

amplamente cultivada em terras altas, ou condições de sequeiro (FONSECA et al., 2007).

A transformação por biobalística tem viabilizado a produção de plantas transgênicas de muitas espécies recalcitrantes (SHARMA; BHATNAGAR-MATHUR; THORPE, 2005) de monocotiledôneas não suscetíveis a *Agrobacterium* (SOOD; BHATTACHARYA; SOOD, 2011). A transformação genética mediada por *Agrobacterium* é preferível por causa da facilidade da técnica, da alta eficiência de transformação, da capacidade de transferir relativamente grandes segmentos de DNA com bordas definidas, e principalmente do mais baixo número de cópias dos transgenes inseridos no genoma do hospedeiro e da esperada herança Mendeliana dos transgenes (SHARMA; BHATNAGAR-MATHUR; THORPE, 2005; SOOD; BHATTACHARYA; SOOD, 2011). É muito importante estabelecer um protocolo eficaz e que possa ser amplamente utilizado para diversas variedades de arroz como no caso da Primavera e estendê-lo para espécies que sejam recalcitrantes como *B. brizantha*.

Culturas embriogênicas ou embriões imaturos continuam sendo os alvos mais utilizados para a transformação de cereais e gramíneas forrageiras (HARWOOD, 2012). A utilização de explantes com elevada taxa de divisão celular é considerada um ponto chave para que a integração do DNA exógeno ocorra na transformação genética de monocotiledôneas (HIEI; KOMARI; KUBO, 1997; VASIL, 2005). A rápida proliferação celular é uma característica de suspensões celulares. Sendo assim, metodologias para obtenção de suspensões celulares (SC) embriogênicas e unidades embriogênicas (UE) são desejáveis para obtenção de plantas transgênicas em monocotiledôneas.

O desenvolvimento de sistemas de transformação genética e regeneração de plantas transgênicas de *B. brizantha* é necessário porque existem demandas atuais para introdução de características de interesse como resistência a cigarrinha das pastagens e à seca, redução de lignina e aumento de biomassa, assim como, estudo da função de genes envolvidos com o modo de reprodução apomítico ou sexual.

O objetivo deste trabalho foi obter plantas transgênicas de *B. brizantha* e *Oryza sativa*, assim como sistemas eficientes de expressão transiente de genes. Com este intuito, nos capítulos I e II são apresentados os sistemas de cultura *in*

vitro estabelecidos para *B. brizantha* a partir de explantes como semente madura, segmentos foliares e segmentos basais, tendo sido obtidos calos, unidades e suspensões celulares embriogênicas. No capítulo III, são descritos diferentes explantes como semente madura intacta, embrião isolado de semente madura, calos embriogênicos e suspensão celular embriogênica submetidos à biobalística e transformados com os genes marcadores *gus* e *hptII*. No capítulo IV, suspensões celulares de *B. brizantha* e unidades embriogênicas de *Oryza sativa* foram co-cultivadas com duas linhagens de *Agrobacterium tumefaciens*. Neste capítulo foi apresentado também o sistema de agroinfiltração para sementes em germinação para as duas espécies de Poaceae.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Brachiaria

O Gênero *Brachiaria* ocupa um espaço importante nas pastagens cultivadas na América tropical e sudeste da Ásia, nas regiões produtoras de carne e leite (VIGNA et al., 2011). Nas últimas décadas, o Brasil tornou-se líder mundial na produção e exportação de gado de corte. Isto ocorreu devido à melhoria no controle de doenças animais, ao aumento na área de terras produtivas, à liberação de cultivares de forrageiras adaptadas às condições adversas edafoclimáticas do Brasil central, e à melhorias no manejo das pastagens (VIGNA et al., 2011). As pastagens cultivadas no Brasil ocupam uma área estimada de 120 milhões de hectares, 85% dos quais são ocupados por espécies de *Brachiaria* (MACEDO, 2006).

Brachiaria é um gênero constituído por cerca de 100 espécies, sendo que a grande maioria delas tem origem no continente africano, incluindo todas as espécies de importância para a pecuária tropical (VALLE et al., 2004). O gênero *Brachiaria* encontra-se inserido na tribo Paniceae; subfamília Panicoideae e família Poaceae, entretanto os critérios taxonômicos utilizados, tanto em relação ao gênero quanto às espécies componentes não são bem definidos (RENVOIZE; CLAYTON; KABUYE, 1996). *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf. (sin. *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) R.D. Webster) cv. Marandu, também conhecida como Braquiarião ou Brizantão, tornou-se o capim mais plantado no Brasil por ser tolerante às cigarrinhas das pastagens (Homoptera: Cercopidae: *Zulia entreriana*, *Deois flavopicta*, *Aeneolamia varia* e *Mahanarva fimbriolata*) (FELISMINO et al., 2012).

Melhoramento genético de Brachiaria

Poucas são as cultivares de forrageiras disponíveis no Brasil resultantes de programas de melhoramento genético propriamente dito. A grande maioria é resultado da seleção realizada sobre acessos introduzidos em grandes coleções representativas da variabilidade natural (VALLE; JANK; RESENDE, 2009), desta forma, o melhoramento genético de plantas forrageiras, principalmente de espécies tropicais, ainda não atingiu o mesmo estágio de desenvolvimento obtido pelo melhoramento de cereais. Portanto, espera-se que o melhoramento

possa promover significativos avanços no aumento da produtividade pecuária (ARAÚJO; DEMINICIS; CAMPOS, 2008).

Essas espécies são muito difíceis de serem melhoradas através de cruzamentos, por apresentarem reprodução apomítica. Apesar da apomixia ser facultativa, *B. brizantha* cv. Marandu se reproduz quase que exclusivamente por apomixia gametofítica ou aposporia (VALLE; SAVIDAN, 1996; ALVES; CARNEIRO; ARAÚJO, 2001). A aposporia é um modo de reprodução que conduz à produção de sementes sem fecundação da oosfera (ASKER; JERLING, 1992). Como consequência, os embriões das sementes apomíticas são propágulos clonais da planta-mãe. Plantas apomíticas podem ser usadas como doadoras de pólen em cruzamentos (VALLE et al., 2004), uma vez que a formação do gametófito masculino segue a via sexual, passando pela meiose. A apomixia ocorre na parte feminina da flor, no óvulo (NOGLER, 1984). A progênie obtida de cruzamento entre uma planta apomítica (♂) e sexual (♀) irá segregar em sexuais e apomíticos, e se a característica desejada se encontra na progênie apomítica, estaserá fixada (DALL'AGNOL; SCHIFINO-WITTMANN, 2005).

Outra característica dessa espécie que dificulta o melhoramento é a ocorrência de diferentes ploidias entre a planta apomítica e a sexual. *B. brizantha* cv. Marandu é tetraplóide ($2n = 4x = 36$) e o acesso sexual é diplóide ($2n = 2x = 18$), inviabilizando os cruzamentos intraespecíficos (VALLE; SAVIDAN, 1996; VALLE et al., 2004).

A transformação genética surge como uma opção para introdução de características agronômicas ou ecológicas desejáveis nessas plantas, uma vez que transgenes inseridos de forma estável numa planta apomítica como a cultivar Marandu, pode levar à geração de uma nova variedade. Por outro lado, plantas apomíticas não passam por meiose, havendo constância do genoma, o que significa manutenção da heterose, ou vigor híbrido (DALTON et al., 2003). Além disso, a introdução de genes candidatos relacionados à apomixia em *B. brizantha* (RODRIGUES et al., 2003; SILVEIRA et al., 2011) é extremamente importante e desejável para análises funcionais por superexpressão e silenciamento (LI et al., 2010). As principais demandas atuais para introdução de características agronômicas em *Brachiaria brizantha* são resistência a cigarrinha das pastagens, tolerância a estresse hídrico, redução de lignina e aumento de biomassa.

Os trabalhos de transformação genética de *Brachiaria* existentes na literatura são com a espécie *B. ruziziensis* ou grama ruzi. No primeiro, foi relatada a obtenção de plântulas expressando genes marcadores usando biobalística (LENIS-MANZANO, 1998), entretanto, nas plantas aclimatadas em casa de vegetação a expressão não pode ser confirmada, nem a inserção do gene foi observada (dados não publicados). Recentemente, Ishigaki et al. (2012) bombardearam calos embriogênicos e multibrotações de *B. ruziziensis* diplóide com um vetor contendo os genes marcadores repórter *gus* e de resistência ao herbicida fosfinotricina (*bar*), ambos sob controle do pUbi1Zm. Calos embriogênicos apresentaram um número significativamente maior de expressão transiente da GUS, sugerindo que calo embriogênico é o explante alvo mais adequado. Os autores relataram a obtenção de quatro calos resistentes ao herbicida bialaphos (10 mg/L), quando calos embriogênicos foram induzidos em meio MS suplementado com 2,4-D 4 mg/L e BAP 0,2 mg/L. Desses quatro calos, dois produziram brotos, dos quais duas plantas expressando estavelmente o gene *gus* foram obtidas. As duas linhagens apresentaram duas ou cinco cópias do gene *gus*, confirmando que foram eventos diferentes de transformação. As plantas transgênicas tiveram fenótipo normal e floresceram, no entanto, não produziram sementes. Plantas férteis transgênicas foram obtidas de calos que haviam sido duplicados (tetraplóide) por colchicina. Para *B. brizantha*, até o momento não existe relato na literatura de transformação genética.

Para desenvolver uma metodologia eficiente de transformação genética é imprescindível que o tecido ou células alvo sejam competentes para a regeneração de plantas verdes (TOYAMA et al., 2002). Culturas embriogênicas ou embriões imaturos continuam sendo os alvos mais utilizados para a transformação genética de cereais e gramíneas forrageiras (HARWOOD, 2012).

Embriogênese somática

A embriogênese em plantas não ocorre apenas a partir do processo de fertilização, pois muitas espécies de dicotiledôneas e monocotiledôneas se reproduzem assexualmente por apomixia (KOLTUNOW; GROSSNIKLAUS, 2003), como ocorre na maioria das espécies de gramíneas do gênero *Brachiaria* (VALLE; SAVIDAN, 1996; FELISMINO et al., 2012). Embriões podem também desenvolver-se ectopicamente a partir de células da haste ou epiderme

foliar, num processo que ocorre naturalmente em espécies epífilas (CHIAPPETTA et al., 2009). Além disso, células gametofíticas e somáticas podem ser cultivadas *in vitro* para a indução do desenvolvimento embrionário de forma direta ou indireta. Embora embriões zigóticos, apomíticos e somáticos possam se desenvolver a partir de diferentes origens celulares e de poderem ser ativados por diferentes sinais, é provável que na fase inicial, todos dependam da mesma via de sinalização (KOLTUNOW; GROSSNIKLAUS, 2003; TUCKER et al., 2003). Isto é consistente com a expressão de genes *SERK* (Somatic embryo receptor-like kinase) na iniciação de embriões zigóticos e somáticos (HECHT; VIELLE-CALZADA; HARTOG, 2001; KOEHLER, 2010) e de embriões que se desenvolvem a partir de oosfera não reduzida (DUSI, 2001), bem como, no desenvolvimento de sacos embrionários de tecido nucelar em espécies apomíticas (ALBERTINI et al., 2005).

Uma célula vegetal meristemática pode seguir duas rotas, crescer e dividir-se sucessivamente, ou alongar-se sem que ocorra divisão. A célula que se divide repetidamente mantém-se essencialmente meristemática, enquanto as células que se alongam irão formar os tecidos e órgão das estruturas vegetais (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007). A possibilidade de obtenção de embriogênese somática ou organogênese a partir de células, tecidos e órgãos vegetais *in vitro* tem gerado numerosas aplicações nos estudos de desenvolvimento e de transformação genética. A determinação do destino das células durante esses processos e durante o desenvolvimento vegetal vêm sendo estudados pelo uso de inibidores de transporte de auxinas na cultura *in vitro* e o uso de mutantes para esses transportadores (FISCHER et al., 1997; OKADA et al., 1991) e pelas análises funcionais dos genes envolvidos na morfogênese com a captura em tempo real de imagens *in vivo* (GORDON et al., 2007). Os hormônios vegetais são os prováveis candidatos na regulação dos passos-chave do desenvolvimento (FEHÉR; PASTERNAK; DUDITS, 2003).

Auxinas e citocininas são os dois principais reguladores de crescimento vegetal envolvidos na regulação da divisão e diferenciação celular, desempenhando importante papel na indução da organogênese e embriogênese somática (SKOOG; MILLER, 1957; STEWARD, 1958). Geralmente, auxinas associadas a níveis reduzidos ou ausência de citocininas, são frequentemente relacionadas como indutoras de embriogênese somática. Níveis elevados de

citocininas geralmente induzem organogênese ou proliferação de gemas adventícias (NIKOLIĆ et al., 2006; WANG et al., 2008). O mecanismo pelo qual esses dois tipos de hormônios vegetais controlam a transição entre a via embriogênica e organogênica têm sido estudado (WANG et al., 2008; DEO et al., 2009, 2010). Em monocotiledôneas, especialmente nas espécies de gramíneas, a regeneração de plântulas foi obtida principalmente através de embriogênese somática (VASIL; VASIL, 1980, 1982; Vasil, 2005). Evidências de mais de uma resposta morfogênica no mesmo explante sob o controle de diferentes concentrações e proporções de auxinas:citocininas foram observadas em espécies da família Poaceae como sorgo, painço, cana-de-açúcar e *Pogonatherum paniceum* (revisado por (WANG et al., 2008).

Assim como em outras espécies (WANG; GE, 2006), a indução de embriogênese somática em *B. brizantha* é dependente do uso de reguladores de crescimento e a combinação de auxinas e citocininas é essencial para indução e diferenciação de embriões somáticos (ES). Os relatos de cultura de tecidos de *Brachiaria* na literatura consistem primeiramente da indução de calos e regeneração de plantas utilizando-se sementes de *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. ruziziensis* e *B. dictyoneura* como explantes iniciais (TOHME et al., 1996). Posteriormente, usando a mesma metodologia, calos foram induzidos a partir de embriões isolados de sementes em 76% dos explantes de *B. brizantha* (LENIS-MANZANO, 1998). A formação de multibrotações e embriões somáticos a partir de meristema apical foi demonstrada para *B. ruziziensis* (ISHIGAKI et al., 2009a). Esse sistema utilizou sementes maduras como explantes, apresentando baixa eficiência de regeneração, com o uso de 4 mg/L de 2,4-D, com um máximo de 21% e 17% de explantes apresentando multibrotações e embriogênese somática, respectivamente. Este sistema de multibrotações foi utilizado com sucesso, na duplicação *in vitro* de cromossomos de *B. ruziziensis* utilizando colchicina (ISHIGAKI et al., 2009b) e para transformação genética via biobalística (ISHIGAKI et al., 2012).

Em *B. brizantha* cv. Marandu, relatou-se a obtenção de calos embriogênicos a partir do embrião isolado da semente em 73% dos explantes, enquanto 67% dos calos embriogênicos regeneraram plantas (SILVEIRA et al., 2003). Mais recentemente, a histologia do embrião isolado da semente cultivada *in vitro* foi mostrada (LENIS-MANZANO et al., 2010). A formação de

multibrotações foi relatada em cultura de segmentos basais de plântulas micropropagadas desta cultivar (PINHEIRO et al., 2000), sendo este sistema eficiente para duplicação cromossômica *in vitro* de espécies de *Brachiaria*. No entanto, *B. brizantha* ainda é considerada recalcitrante à cultura de tecidos, e métodos eficientes associados com os sistemas de transformação genética ainda são escassos na literatura.

A obtenção de um sistema de embriogênese somática secundária ou repetitiva é extremamente desejável para a propagação clonal em massa. Embriões secundários originam-se a partir de células superficiais individuais ou por pequenos aglomerados celulares, geralmente no cotilédono ou hipocótilo do embrião primário (RAEMAKERS; JACOBSEN; VISSER, 1995; LI; KRASNYANSKI; KORBAN, 2002). A origem do embrião somático é especialmente relevante para a uniformidade genética das plantas regeneradas, uma origem multicelular pode resultar na formação de plantas quiméricas. A origem unicelular é o caminho desejado para aplicações práticas de clonagem através de embriões somáticos, como no caso da transformação genética. No entanto, na maioria dos sistemas relatados, embriões somáticos se formam a partir de pequenos agregados celulares embriogênicos que se originam de células ricas em citoplasma. Normalmente essas células são pequenas, com conteúdo citoplasmático denso, núcleos grandes com nucléolos proeminentes, vacúolos pequenos e presença de grãos de amido. As propriedades histoquímicas destas células sugerem intensa atividade metabólica e de síntese de RNA, que morfológicamente se assemelham a células meristemáticas (VASIL, 2005; BURRIS et al., 2009; DEO et al., 2010; GAMBINO et al., 2011).

A origem da embriogênese somática, se direta ou indireta, pode ser de difícil definição e, em alguns casos, ambas podem ser observadas no mesmo sistema (RAEMAKERS; JACOBSEN; VISSER, 1995). Em muitas espécies, a embriogênese somática tem sido descrita como indireta, no entanto, o calo embriogênico apresenta-se organizado e apresenta proembriões, numa massa proembriogênica. Na maioria dos casos, massas proembriogênicas ou unidades embriogênicas proliferam-se a partir de embriões somáticos, sendo que embriões secundários desenvolvem-se a partir dessas massas ou unidades embriogênicas, caracterizando-se por um processo de embriogênese indireta. Tais culturas apresentam dificuldade de sincronização, com sucessivos ciclos de

embriogênese secundária, também denominada de embriogênese repetitiva. Em outros casos os embriões desenvolvem-se até a maturidade, facilitando a identificação da embriogênese direta. Nestes casos, é mais fácil distinguir entre os diferentes ciclos de embriogênese secundária (revisado por RAEMAKERS; JACOBSEN; VISSER, 1995).

Em milho (TAYLOR; VASIL, 1991), mandioca (SCHÖPKE et al., 1996; TAYLOR et al., 2001) e em *Quercus suber* (PUIGDERRAJOLS; MIR; MOLINAS, 2001) o desenvolvimento de embriões somáticos se dá pela rediferenciação de células epidérmicas e subepidérmicas que se proliferam dando origem a uma massa esférica, compacta, nodular e convoluta formada por um complexo proembriogênico definido como unidade embriogênica (UE). Essa massa compacta de proliferação de células meristemáticas, ou unidade embriogênica, precede a formação de embriões secundários, mas não é considerada como um calo verdadeiro por apresentar um certo grau de organização do tecido, sendo capaz de se proliferar indeterminadamente como geralmente ocorre na proliferação de calos. Portanto, as células nas UE são consideradas como células pré-determinadas embriogenicamente, ou seja, competentes para a embriogênese somática.

Uma elevada taxa de divisão celular nos explantes usados para transformação genética de monocotiledôneas é considerada um pré-requisito para que a integração do DNA exógeno ocorra (HIEI; KOMARI; KUBO, 1997; VASIL, 2005), e a rápida proliferação celular é uma característica de suspensões celulares. Sendo assim, suspensões celulares (SC) embriogênicas podem ser uma das melhores fontes de explantes para obtenção de plantas transgênicas em monocotiledôneas.

Muitos fatores podem influenciar a cultura de tecidos, dentre eles um dos fatores determinantes para o sucesso do cultivo *in vitro* é a contaminação microbiana. Os microrganismos endofíticos têm sido mencionados em vários estudos como fontes de contaminação na micropropagação, porém, sua presença tem sido demonstrada como auxiliar à planta, tanto pela promoção de crescimento, como pelo aumento da resistência a patógenos. Os endofíticos vivem no interior dos tecidos das plantas, normalmente nos espaços intercelulares e vasos condutores, sem causar sintomas de sua presença; podendo, no caso específico do cultivo *in vitro*, favorecer o ajuste osmótico, a produção de

fitormônios e absorção de nutrientes. Na maioria das vezes, esses microrganismos não se manifestam de forma visível e nem crescem no meio de cultura, sendo observados somente em análises microscópicas dos explantes cultivados *in vitro*, contradizendo, portanto, a suposição de que estes cultivos são axênicos (DONGYI; KELEMU, 2004; ESPOSITO-POLESI, 2011; KELEMU et al., 2011; SANCHEZ-MARQUEZ et al., 2011).

Transformação Genética de plantas

Método que consiste na introdução de ácidos nucleicos em células vegetais. Dentre os métodos de transformação genética direta, a biobalística é o mais usado para a transformação de plantas, pois este método garantiu a transferência de DNA exógeno para o genoma nuclear e do cloroplasto de várias espécies (CARRER et al., 1993; TOYAMA et al., 2002; ALTPETER et al., 2005a; WANG; GE, 2006; VAIN, 2007). O processo de biobalística ou aceleração de partículas foi inicialmente proposto por Sanford et al. (1987), e utiliza micropartículas (0,2 a 4 µm de diâmetro) em alta velocidade (1.500 km/h) para introduzir ácidos nucléicos e macromoléculas em células e tecidos vivos (KLEIN; WOLF; SANFORD, 1987; CHRISTOU; FORD; KOFRON, 1991). As partículas (de ouro ou tungstênio), penetram a parede e membrana celular de maneira não letal, podendo algumas vezes causar danos irreversíveis, em função das condições aplicadas e do tipo de explante a ser bombardeado. Posteriormente, o DNA é integrado no genoma. O acelerador de partículas através da compressão e rápida liberação do gás Hélio gera uma onda de choque com energia suficiente para deslocar a membrana carreadora contendo as micropartículas cobertas com DNA (SANFORD et al., 1991; ARAGÃO et al., 1996).

A ausência de restrições biológicas, pelo menos até o DNA ter sido introduzido na célula vegetal, significa que a biobalística é um método de transformação versátil e eficaz, não limitado pelo tipo de célula, espécie ou genótipo. Como não existem requisitos intrínsecos ao vetor, os transgenes de qualquer tamanho e arranjo podem ser introduzidos, lineares ou circulares, e a co-transformação para múltiplos genes é relativamente simples (TOYAMA et al., 2002; SAIRAM et al., 2005). Até o início do século, a maioria das plantas monocotiledôneas transgênicas foram obtidas usando biobalística, uma vez que

essas plantas eram consideradas fora da gama de hospedeiros da *Agrobacterium* (SOOD; BHATTACHARYA; SOOD, 2011).

Na biobalística muitos parâmetros podem afetar a eficiência de transformação e os tratamentos pré e pós-transformação desempenham um papel significativo. Suspensões celulares (SC) embriogênicas de milho apresentaram um aumento na eficiência de transformação de quatro vezes, quando mantidas durante 4 h antes, e 16 a 20 h após o bombardeamento, em 0,2 M de cada sorbitol e manitol (VAIN; McMULLEN; FINER, 1993). Nos mesmos períodos de tratamento osmótico pré e pós bombardeamento, utilizando 0,3 M de manitol e 0,3 M de sorbitol no meio de cultura de calos embriogênicos, a frequência de obtenção de plantas transgênicas de *Paspalum notatum* foi aumentada (ALTPETER; JAMES, 2005; GONDO et al., 2005). Usando tratamento semelhante ao usado para *Paspalum*, multibrotações e calos embriogênicos de grama Rodes (*Chloris gayana*) e de grama Ruzi (*Brachiaria ruziziensis*) foram bombardeados e plantas obtidas (GONDO et al., 2009; ISHIGAKI et al., 2012). A plasmólise ou desidratação parcial das células ou tecidos por tratamento osmótico geralmente mantém o potencial de pressão de células feridas, reduzindo ou impedindo o dano celular e/ou vazamento de protoplasma (FINER; McMULLEN, 1991). A eficiência de transformação também pode ser aumentada por bombardeios repetidos e pela otimização da pressão utilizada. Embora a aplicação de dois tiros tenha melhorado a expressão transiente em trigo (LONSDALE; ONDE; CUMMING, 1990), o maior dano no tecido gerou uma expressão reduzida em cevada (KARTHA et al., 1989). Dependendo do genótipo, o tamanho e a concentração de partículas de ouro ou tungstênio, e a distância do anteparo são outros fatores também importantes e governam a eficiência de transformação de monocotiledôneas via biobalística (WANG; GE, 2006).

As desvantagens da biobalística são o custo, a necessidade do aparelho e a tendência da geração de transformantes contendo múltiplas cópias do transgene que podem estar rearranjados e/ou quebrados (KOHLI et al., 1999; ALTPETER et al., 2005). Embora a integração de cópia única de transgenes tenha sido demonstrado em gramíneas transgênicas obtidas por biobalística, a maioria dos transformantes apresenta padrões complexos de integração dos transgenes (revisado por WANG; GE, 2006). Apesar disso, a transformação

direta por biobalística é um procedimento reprodutível, que pode ser adaptado de um laboratório para outro e a introdução de genes em células e tecidos vegetais por microprojéteis levou à produção de plantas transgênicas de muitas espécies recalcitrantes. Culturas embriogênicas ou embriões imaturos continuam sendo os alvos mais utilizados para a transformação de cereais e gramíneas forrageiras por biobalística (SHARMA; BHATNAGAR-MATHUR; THORPE, 2005; HARWOOD, 2012).

O método de transformação indireto mais utilizado é o mediado por *Agrobacterium* (BROOHAERTS et al., 2005; VAIN, 2007). Na natureza, linhagens selvagens de *Agrobacterium tumefaciens* são conhecidas como agentes etiológicos da doença "galha da coroa" em um número limitado de espécies de plantas economicamente importantes. No laboratório, linhagens desarmadas de *A. tumefaciens* sob condições controladas, podem transformar outras espécies eucarióticas, variando de fungos até células humanas (KARAMI et al., 2009). Atualmente, a transformação mediada por *Agrobacterium* é o método mais usado para produzir plantas transgênicas em dicotiledôneas e monocotiledôneas, incluindo as principais culturas econômicas, cereais, legumes, ornamentais, medicinais e gramíneas forrageiras (VAIN, 2007; SOOD; BHATTACHARYA; SOOD, 2011).

A transformação via *Agrobacterium* resulta na produção de uma cópia de fita simples de molécula de T-DNA (*Transferred-DNA*) pela maquinaria de virulência bacteriana, que é transferida e integrada no genoma da célula hospedeira. A interação entre agrobactéria e células vegetais pode ser dividida em várias etapas: o reconhecimento químico do hospedeiro e ativação da expressão dos genes de virulência (genes *vir*) da agrobactéria, a interação física entre bactéria e célula vegetal, a produção de proteínas VIR pela maquinaria de transferência da bactéria e clivagem do T-DNA, a transferência das proteínas VIR e direcionamento do T-DNA (complexo-T) da bactéria para dentro da célula vegetal, o movimento do complexo-T do citoplasma para o núcleo da célula vegetal, a integração do T-DNA no genoma hospedeiro, e a expressão do T-DNA na célula vegetal hospedeira (para revisões recentes McCULLEN; BINNS, 2006; PITZSCHKE; HIRT, 2010).

Os genes *vir* são essenciais para a virulência da agrobactéria e encontram-se fora do T-DNA. A indução dos genes *vir* depende de moléculas-

sinhal presentes no exudato das células vegetais. A ativação dos genes *vir* requer dois genes, *virA* e *virG*, que são constitutivamente expressos em nível basal e codificam um sistema de dois componentes no qual *virA* é um sensor ligado à membrana e *virG* é o regulador de resposta intracelular. Os sinais da planta como fenóis, monossacarídeos, pH baixo e baixo fosfato são percebidos por *virA*. Fenóis são indispensáveis para a indução dos genes *vir*, enquanto os outros sinais sensibilizam *virA* para a percepção de fenol. Acetoseringona é utilizada rotineiramente para aumentar a eficiência de transformação de planta mediada por *Agrobacterium*. A capacidade do sistema *virA/virG* de reconhecer uma diversidade de fenóis e açúcares talvez seja uma explicação para a ampla gama de hospedeiros exibida por *Agrobacterium* (revisado por AZADI et al., 2010; SOOD; BHATTACHARYA; SOOD, 2011).

A elevada taxa de divisão celular em tecidos meristemáticos de milho, trigo e outros cereais aumentaram a suscetibilidade à infecção por *Agrobacterium* (revisado por KARAMI, 2009). A frequência de recuperação de plantas transgênicas foi melhorada pelo uso de tratamento osmótico durante a co-cultura, que ainda suprimiu o supercrescimento de *Agrobacterium* na superfície dos explantes. Dependendo da espécie, o pré-tratamento osmótico com sorbitol e/ou manitol ou pela adição de açúcares metabolizáveis como sacarose, também aumentou a competência de células de arroz e de milho de forma eficaz (SOOD; BHATTACHARYA; SOOD, 2011). A substituição de meio líquido por sólido e a dessecação de explantes pré e/ou pós co-cultura melhorou a eficiência de transformação de cana de açúcar, trigo, arroz e milho. Várias melhorias significativas na eficiência de transformação foram induzidas pela otimização dos procedimentos. Por exemplo, a ligação da *A. tumefaciens* foi facilitada pela eliminação de substâncias inibidoras e/ou cutículas cerosas na superfície de explantes por agentes químicos e tensoativos como Tween 20 e Silwet L77 (revisado por revisado por KARAMI et al., 2009; TIE et al., 2012). A utilização de uma densidade ótima de *Agrobacterium* pode também facilitar a fixação de bactérias na superfície do explante. No entanto, a densidade populacional é um requisito que varia de planta para planta. O curto período de inoculação foi recomendado quando uma maior densidade de *A. tumefaciens* foi absolutamente necessária para explantes de plantas recalcitrantes. Uma vez que a indução dos genes *vir* conduzem à transferência e integração do T-DNA,

passos que ocorrem durante o período de co-cultura, este requer otimização no que diz respeito à duração, composição e pH do meio e temperatura (revisado por PITZSCHKE; HIRT, 2010). Em geral, 2-7 dias de co-cultura foram necessários para a transformação bem sucedida da maior parte dos membros da família Poaceae. As temperaturas ideais de co-cultura para a maioria das monocotiledôneas variavam entre 23 a 25 °C. Particularmente, 22 °C resultou em maior expressão transiente da β -glucuronidase (GUS), em 64% do total de calos de alho quando 18, 20, 22 e 24 °C foram testados. Um certo número de culturas, em particular arroz foram também transformados com sucesso pela otimização de parâmetros como a composição do meio contendo açúcares (particularmente D-glucose, D-manose, D-galactose, D-talose, D-xilose ou L-arabinose), reguladores de crescimento vegetais e produtos químicos (glicinabetaína) aumentaram a indução de genes por acetoseringona em pH baixo, assim como a redução na concentração de sais dos meios de inoculação e co-cultura (revisado por KARAMI et al., 2009; PITZSCHKE; HIRT, 2010; SOOD; BHATTACHARYA; SOOD, 2011; TIE et al., 2012). Em arroz, a atividade de GUS foi máxima quando o CaCl_2 foi reduzido para de 440 mg/L para 50 mg/L no meio de co-cultura (RASHID et al., 1996; SALLAUD et al., 2003). Em grama esmeralda (*Zoysia tenuifolia*) a redução de cálcio no meio de co-cultura também aumentou a expressão transiente de GUS (LI et al., 2010). O cálcio desempenha um papel crucial na resistência da planta a microrganismos patogênicos. Assim, a remoção de cálcio do meio de co-cultura pode reduzir a resistência da planta contra a infecção por *Agrobacterium*, resultando numa maior frequência de transformação (TOYAMA et al., 2002).

Expressão transiente ou transitória de genes

A transformação genética ocorre, resumidamente em duas fases: na primeira o DNA é introduzido na célula, seguida pela integração do DNA no genoma. A fase de integração é muito menos eficiente do que a fase de introdução do DNA, resultando numa pequena proporção de células que incorpora o DNA no genoma de forma estável. Quando o DNA é introduzido nas células este pode ser expresso por um curto período, expressão transiente ou transitória, e quando não é integrado, normalmente é degradado por nucleases. Portanto, sistemas de expressão transiente de genes são ideais para avaliação e

comparação de construções gênicas e vetores (ALTPETER et al., 2005; VANDERGHEYNST; GUO; SIMMONS, 2008; LI et al., 2009; CHEN et al., 2010), sendo importante para a produção de proteínas recombinantes, mesmo antes da expressão estável em plantas (ALTPETER et al., 2005).

A transformação via biobalística e via *Agrobacterium* são utilizadas para estudos de expressão transiente de genes. A agroinfiltração é um método de expressão transiente no qual *Agrobacterium tumefaciens* é infusa na planta. O sistema de agroinfiltração pode ser muito útil para indicar a suscetibilidade da planta a ser transformada, visto que no processo de transformação *A. tumefaciens* transfere o transgene para o núcleo de células de plantas compatíveis ou suscetíveis, sendo possível a expressão transitória desse transgene (revisado por CHEN et al., 2010).

Genes marcadores

Os genes marcadores de seleção mais usados para Poaceae têm sido os que codificam para as enzimas higromicina-fosfotransferase (HPTII) (VAN DEN ELZEN et al., 1985) e para a fosfinotricina-acetiltransferase (BAR e PAT) (DE BLOCK et al., 1987), sendo o gene *hptII* o mais utilizado para gramíneas forrageiras (VAIN, 2007). Como muitas gramíneas têm tolerância endógena a alguns antibióticos, a janela de seleção fica bastante estreita, como é o caso da tolerância de *B. brizantha* a altas doses de canamicina (LENIS-MANZANO, 1998). A utilização de um promotor forte é um requerimento básico para aumentar o nível de resistência das células transformadas ao agente seletivo, no caso o antibiótico, conduzindo a uma seleção mais eficiente. O estabelecimento de seleção eficiente através da aplicação de pressão de seleção adequada num período de tempo adequado é um dos aspectos críticos do sucesso para geração de gramíneas transgênicas (TIE et al., 2012).

Os genes marcadores repórteres têm sido desenvolvidos a partir de genes bacterianos que codificam para proteínas que são facilmente detectadas. Os mais usados hoje em dia são o gene *gus* (β -glucuronidase) (JEFFERSON, 1987) e o gene que codifica para a proteína verde fluorescente (GFP) (CHIU et al., 1996). Mais recentemente, variações de proteínas fluorescentes como a amarela (YFP), a vermelha (RFP) e a azul (BFP) (GORDON et al., 2007, 2009) têm sido muito utilizadas.

Sequências promotoras da expressão gênica em Poaceae

Os genes a serem introduzidos nas células vegetais devem estar sob o controle de uma sequência promotora. Além da escolha do promotor, outra ferramenta disponível para aumentar a expressão do transgene é a utilização do primeiro intron de um gene. Quando o primeiro intron do gene de *ACT2* de *Arabidopsis thaliana* foi clonado entre o promotor deste gene e a sequência codificadora do gene *gus*, a expressão da GUS foi aumentada em 13 vezes (JEONG et al., 2009). A inclusão do primeiro intron do gene poliubiquitina 10 de *Arabidopsis* (UBQ10) deu um incremento de três vezes na expressão em cevada em relação às plantas controle (BARTLETT; SNAPE; HARWOOD, 2009).

Os promotores mais usados para Poaceae são os promotores constitutivos do gene de actina de *Oryza sativa* - pAct1Os (McELROY et al., 1990) e o promotor do gene de ubiquitina 1 de *Zea mays* - pUbi1Zm (CHRISTENSEN; QUAIL, 1996).

Neste trabalho foram utilizados os plasmídeos pAHC27(CHRISTENSEN; QUAIL, 1996), pAct1D (McELROY et al., 1990) e pAHUG, contendo o gene *gus* dirigido pelo promotor pUbi1 de milho ou pAct1 de arroz, e dois vetores binários, pGPro1 e pGPro2 (THILMONY et al., 2006, 2009). No sistema vetorial pGPro/pSoup (THILMONY et al., 2006) a origem de replicação do pGPro1 para *Agrobacterium* (pSA) atua em *trans* no gene da replicase RepA presente no plasmídeo pSoup. Estes plasmídeos são compatíveis e coexistem no interior de células de *Agrobacterium* transformadas. Ao remover a função RepA e outras funções de conjugação desnecessárias, o tamanho global do vetor binário foi drasticamente reduzido (HELLENS et al., 2000). O T-DNA do pGPro1 e 2 possui ainda duas bordas esquerdas, com o intuito de favorecer a transferência apenas do T-DNA. Os vetores possuem dois genes marcadores, um gene repórter fusionado *gus/gfp* que codifica para ambas as proteínas GUS e GFP, e um gene marcador de seleção o *hptII* (THILMONY et al., 2006). Esses vetores apresentam um *polylinker* para clonagem do promotor a ser testado antes do gene de fusão marcador repórter *gus/gfp*. O gene marcador de seleção *hptII* é dirigido pelo promotor do gene de actina1 de arroz (pAct1Os). No pGPro1 o pAct1 utilizado é o tipo selvagem, enquanto no pGPro2 o pAct1 apresenta duas mutações que intensificam a sua transcrição (comunicação pessoal Dr. Roger Thilmony).

Oryza sativa

O arroz (*Oryza sativa* L.) cultivado tem origem asiática e o menor genoma ($2n = 24$, $n = 0,45$ pg e 430 Mb) entre culturas gramináceas, e desde o final da década de 90, é espécie modelo para estudos de genômica funcional de cereais e gramíneas por ter metodologia para transformação genética estabelecida (HIEI et al., 1994; HIEI; KOMARI; KUBO, 1997; SALLAUD et al., 2003). Sua genética é bastante conhecida, com mapa físico densamente saturado com marcadores moleculares e com grandes similaridades de seqüências de genes, estrutura e função gênica com todos os cereais e gramíneas (UPADHYAYA, 2007). Possui saco embrionário dotipo *Polygonum*, característico de plantas sexuais, e por ser diplóide, a análise da expressão de genes introduzidos em arroz fica mais facilitada. Milhares de mutantes e transformantes de arroz têm sido obtidos, principalmente de cultivares do grupo Japônica (SHIMAMOTO; KYOZUKA, 2002; SALLAUD et al., 2003). Além disso, o genoma inteiro da cultivar de arroz Japônica Nipponbare foi sequenciado, e usando os bancos de dados de seqüências é possível explorar novos genes. Milhares de seqüências de cDNA também da cv. Nipponbare foram obtidas, mapeadas e anotadas, e os bancos de dados são de livre acesso (JUNG; GYNHEUNG; RONALD, 2008).

A cultura *in vitro* e a transformação genética em arroz são metodologias extremamente dependentes da resposta de cada genótipo (TIE et al., 2012). A cultivar BRS Primavera é precoce de grãos longo-fino e indicada para plantio em áreas pouco ou moderadamente férteis, amplamente cultivada no Brasil, em terras altas, ou condições de sequeiro (SOARES et al., 2001; FONSECA et al., 2007). Apesar de pertencer ao grupo Japônica, é classificada como Japônica tropical, que em termos de recalcitrância assemelha-se às do grupo Indica, grupo que compreende as cultivares mais recalcitrantes à regeneração e transformação genética de *O. sativa* (RASHID et al., 1996; TIE et al., 2012).

A transformação genética de arroz mediada por *Agrobacterium* tem sido utilizada em vários laboratórios desde a década de 90 e extensos esforços têm sido feitos para melhorar a eficiência do método. A freqüência de transformação de algumas cultivares, especialmente das do grupo Indica e Japônica tropical, que respondem por aproximadamente 80% do arroz cultivado, ainda é insatisfatório, e apenas um número limitado foi geneticamente manipulado de forma eficiente (TIE et al., 2012). Similarmente, sobre a cultivar Primavera existe apenas um relato na literatura que demonstra que o meio MS foi testado e

resultou na regeneração de brotos em 7 a 18% dos calos obtidos; e a expressão do gene *gus* em 67% dos calos co-cultivados com a linhagem LBA4404pTOK233 (BEVITÓRI, 2005). Neste relato, não há descrição sobre o prosseguimento da cultura dos calos ou da obtenção de plantas.

Capítulo I: Embriogênese somática e organogênese em *Brachiaria brizantha* apomítica e sexual¹

Resumo

Brachiaria brizantha (sin. *Urochloa brizantha*) é uma importante gramínea forrageira tropical que é amplamente cultivada no Brasil. Para otimizar as condições de cultura *in vitro* para *B. brizantha*, sementes maduras, segmentos basais e segmentos foliares de plantas crescidas *in vitro* do genótipo sexual e apomítico foram analisadas. Quando cultivadas em diferentes meios, segmentos foliares produziram calos não embriogênicos que formaram muitas raízes. Calos friáveis de sementes maduras e segmentos basais incubados em meios Murashige and Skoog (MS) suplementados com ácido 2,4-diclorofenoacético (2,4-D) and 6-benziladenina (BA) produziram estruturas embriogênicas compactas e nodulares em 80% dos explantes. Calos com tais estruturas compactas e embriogênicas foram altamente regeneráveis após serem transferidos para meio suplementado com cinetina (KIN) e ácido naftaleno acético (ANA). Produziram embriões somáticos isolados, múltiplos escutelos fusionados ou escutelos isolados com poliembriões que germinaram em brotos isolados ou multibrotações. Plantas verdes morfológicamente normais foram obtidas para os dois genótipos. Mudança no pH de 5,8 para pH 4 aumentou o número de explantes que formaram calos, assim como, os que regeneraram brotos e o número de brotos por explante. Quando calos embriogênicos de sementes maduras foram sucessivamente subcultivados por quatro meses, visando embriogênese repetitiva, todas as plantas regenerantes obtidas foram albinas. A natureza embriogênica das estruturas compactas foi confirmada por microscopia eletrônica de varredura.

Palavras-chave: plantas albinas. apomixia. organogênese. embriogênese somática repetitiva. capim-braquiária.

¹CABRAL, G.B.; CARNEIRO, V.T.C.; LACERDA, A.L.; DO VALLE, C.; MARTINELLI, A.P.; DUSI, D.M.A. Somatic embryogenesis and organogenesis in apomictic and sexual *Brachiaria brizantha*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.107, n.2, p.271-282, 2011.

Abstract

Brachiaria brizantha (syn. *Urochloa brizantha*) is an important tropical forage grass widely cultivated in Brazil. In order to optimize tissue culture conditions for *B. brizantha*, *in vitro* culture of mature seeds, basal segments and leaf segments from *in vitro* plants of an apomictic and a sexual genotype of *B. brizantha* was performed. When cultured on different media, leaf segments yielded non-embryogenic calluses which formed several roots. Friable calluses from mature seeds and basal segments explants incubated on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 6-benzyladenine (BA) yielded 80% compact and nodular embryogenic structures. Calluses with such compact embryogenic structures were highly regenerable upon transfer to medium supplemented with kinetin (KIN) and naphthalene acetic acid (NAA). They produced isolated somatic embryos, multiple fused scutelli or isolated scutellum with polyembryos that germinated into isolated or multiple shoots. Green and morphologically normal plants were obtained for the two genotypes. Changing the media from pH 5.8 to pH 4.0 increased the number of explants that formed calluses as well as the number of shoots per explant. When embryogenic calluses from mature seeds were successively sub-cultured for four months, aiming at repetitive somatic embryogenesis, all the regenerated plants were albinos. The embryogenic nature of the compact structure was confirmed by scanning electron microscopy.

Keywords: albino plants. apomixis. organogenesis. repetitive somatic embryogenesis. signalgrass.

3.1 Introdução

Brachiaria brizantha (sin. *Urochloa brizantha*; Shirasuna 2010) é uma gramínea forrageira altamente produtiva que se adapta bem a diferentes solos e condições ambientais, sendo largamente cultivada no Brasil e outros países tropicais. Características reprodutivas neste gênero, entretanto, dificultam o programa de melhoramento. *Brachiaria brizantha* cv. Marandu é uma planta apomítica, tetraplóide fértil ($2n=4x=36$) (VALLE; SAVIDAN, 1996; ARAÚJO et al., 2000), e pseudogâmica (NGENDA HAYO, 1988; ALVES; CARNEIRO; ARAÚJO, 2001). Dentre os genótipos de *B. brizantha*, o diplóide sexual ($2n=2x=18$) produz poucas sementes viáveis (ARAÚJO; FALCÃO; CARNEIRO, 2007). Devido ao modo de reprodução assexual, o melhoramento genético de *B. brizantha* é restrito à seleção de cultivares superiores a partir da variabilidade natural (EUCLIDES; MACEDO; VALLE, 2008) ou o uso de plantas apomíticas como doadoras de pólen em cruzamentos interespecíficos (VALLE; JANK; RESENDE, 2009). O uso potencial de transformação genética como ferramenta para a introdução de características desejáveis nesta cultura requer uma metodologia eficiente de transformação genética, o qual depende de um método de cultura de tecidos que ainda não está estabelecido.

A indução de calos e regeneração de plantas foi reportada pela primeira vez por Tohme et al. (1996) usando como explante inicial sementes de *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. ruziziensis* e *B. dictyoneura*. Posteriormente, usando a mesma metodologia, mas em embriões isolados das sementes, Lenis-Manzano (1998) reportou que 76% dos embriões de *B. brizantha* formaram calos embriogênicos, tendo sido enfatizado que, em alguns casos, mais de uma planta foi obtida a partir de um calo. Recentemente, multibrotações e embriogênese somática a partir de meristema apical oriundo de semente foram demonstrados para *B. ruziziensis* (ISHIGAKI et al., 2009a). O sistema desenvolvido é baseado em sementes maduras e apresentou uma baixa eficiência na produção de embriões e brotos, usando 4 mg/L 2,4-D, sendo que as maiores frequências de multibrotações e embriogênese somática obtidas foram de 21% e 17%, respectivamente.

Em *B. brizantha* cv. Marandu, Silveira et al. (2003) reportaram a resposta de embriões de sementes isoladas em cultura de tecidos, comparando a

combinação de meios usada por Lenis-Manzano (1998) com outra composição. Calos embriogênicos foram obtidos em 73%, e regeneração de plantas em 67% dos explantes inicialmente cultivados. Apesar da alta frequência, a rápida diferenciação de calos friáveis em calos embriogênicos foi acompanhada pela oxidação dos escutelos, que apresentaram desenvolvimento bloqueado (dados não publicados). Mais recentemente, a histologia de embriões isolados de sementes e cultivados usando o sistema previamente descrito por Thome et al. (1996) foi apresentada (LENIS-MANZANO et al., 2010). Múltiplas brotações foram reportadas em culturas de segmentos basais, os quais foram coletados da região meristemática logo acima das raízes de plantas de *B. brizantha* cultivadas *in vitro* em meio LS (LINSMAIER; SKOOG, 1965) suplementado com reguladores de crescimento (PINHEIRO et al., 2000) Este sistema foi eficiente para duplicação de cromossomo de *Brachiaria* spp. *in vitro*. Entretanto, *B. brizantha* ainda é considerada recalcitrante para cultura *in vitro* e um método de cultura de tecido eficiente associado com sistema de transformação genética ainda não foi relatado na literatura atual. O estabelecimento de método de cultura de tecido *in vitro* e o entendimento das características morfogênicas do desenvolvimento dos explantes possibilitará a seleção da melhor rota de regeneração a ser usada para transformação genética de *Brachiaria*.

Neste trabalho reportamos o uso potencial de sementes maduras para organogênese, assim como o método de embriogênese somática e regeneração de *B. brizantha* apomítica. Embriogênese somática é também demonstrada para segmentos basais das plantas apomítica e sexual. O efeito de diferentes meios e pH ácido na embriogênese somática e regeneração de plantas é discutido. Além disso, pela primeira vez, uma caracterização morfo-anatômica detalhada do processo de embriogênese somática usando microscopia de luz e eletrônica de varredura foi apresentada para *B. brizantha*. Estes sistemas podem ser usados para transformação genética de *B. brizantha*.

3.2 Material e Métodos

Material vegetal

Plantas do genótipo natural tetraplóide apomítico de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu (coleção EMBRAPA número BRA000591) e um diplóide sexual (BRA002747) foram cultivadas na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Sementes da cv. Marandu foram gentilmente cedidas pela Embrapa Gado de Corte, MS, Brasil.

Micropropagação

Caules de plantas crescidas no campo de ambos cultivares foram coletadas e folhas e bainhas removidas. O explante consistiu de nó caulinar, seccionado longitudinalmente, com gema axilar, tendo a maioria dos tecidos vasculares sido removidos. Os explantes foram lavados em etanol 70%, para desinfestação superficial com solução de hipoclorito de sódio a 5% e Tween 20 0,1% em água, por 20 min, seguido por três enxagues em água destilada autoclavada. O excesso de água dos 30 explantes de cada genótipo foi removido em papel filtro autoclavado antes da inoculação em meio LS (LINSMAIER; SKOOG, 1965) suplementado com 1mg/LANA, 3 mg/LCIN (PINHEIRO et al., 2000) e 0 ou 3 mg/L BAP, e cultivado a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ sob um fotoperíodo de 14 h. O número de explantes que formaram gemas e o número médio de brotos obtidos por explante foram relatados a partir de observações para cada tratamento, em dois experimentos independentes, tendo sido aplicado o teste Tukey's a $P > 0,05$. Os brotos obtidos foram isolados e transferidos para o meio de manutenção de plantas, MMP (Tabela 1.1), onde desenvolveram raízes. As plântulas foram subcultivadas *in vitro* em intervalos de 6 semanas e mantidas como fonte de explantes para: segmentos basais, que consiste em segmentos de 0,5 cm logo acima das raízes das plântulas *in vitro* (PINHEIRO et al., 2000) e folhas jovens, testadas para indução de embriogênese somática.

Organogênese de sementes maduras

Sementes maduras do genótipo apomítico foram descascadas e desinfestadas em etanol 70% por 5 min, seguido por 40 min em solução de hipoclorito de sódio a 5% com Tween 20 a 0,1% e lavadas 5 vezes em água destilada autoclavada. Essas foram colocadas em placas de Petri contendo meio de indução de organogênese direta, MIO (Tabela 1.1), suplementado com 3 mg/L CIN e 1 mg/LANA ou 3 mg/L BAP e 0,3 mg/LANA. As culturas foram mantidas em câmaras de crescimento a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro, por 38 dias.

Tabela 1.1 – Meios de cultura usados para micropropagação, organogênese, indução de embriogênese somática e regeneração de plantas de *Brachiaria brizantha*

Meios	Componentes
LS	Sais de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), 100 mg/L tiamina, 100 mg/Lmio-inositol, 100 mg/L caseína hidrolisada, 30 g/L sacarose (LINSMAIER; SKOOG, 1965)
MMP	sais de MS (macronutrientes ½ concentração), vitaminas MS, caseína hidrolisada 100 mg/L, sacarose 20 g/L, ANA 0,2 mg/L, 0,5 mg/L CIN, 0,2 mg/LGA ₃
MIO	Meio basal de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), 100 mg/L caseína hidrolisada, 100 mM glutamina.
M1	Meio basal de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), 100 mg/L caseína hidrolisada, 2 mg/L2,4-D, 0,2 mg/L BAP (LENIS-MANZANO, 1998)
M1.2	M1 sem BAP 4 mg/L 2,4-D (SILVEIRA et al., 2003)
M1.3	M1 com 300 mg/L caseína hidrolisada, 3 mg/L2,4-D, 0,2 mg/LBAP
MS1	Sais de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), 100 mg/Lmio-inositol, 0,1 mg/LANA, 0,4 mg/L CIN (LENIS-MANZANO, 1998)
MS2	MS1 sem ANA e 4 mg/L kinetin (SILVEIRA et al., 2003)
MS3	MS meio basal (MURASHIGE; SKOOG, 1962), 300 mg/Lcaseína hidrolisada, 0,5 mg/LANA, 1 mg/L BAP, 2,5 mg/L CIN
Todos os meios	pH 5,8 com 1N KOH antes da autoclavagem. Ágar foi 7 g/L, exceto para os meios GA ₃ que foi esterilizado por filtração.

Embriogênese somática

Três tipos de explantes foram usados para indução de embriogênese somática conforme descrito a seguir:

-sementes maduras de plantas apomíticas

Trezentas sementes maduras foram descascadas e desinfestadas conforme descrito acima. Os explantes foram mantidos no escuro a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ em placas de Petri contendo meio de indução de calos M1, M1.2 ou M1.3 por quatro semanas, e transferidas para meio de regeneração MS1, MS2 ou MS3 respectivamente (Tabela 1.1). Foram cultivados sob fotoperíodo de 14 h a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, por 4 semanas. O efeito do pH ácido foi analisado avaliando a resposta da embriogênese somática na combinação de meios M1.3/MS3 em pH 5,8 ou pH 4.

- segmentos basais de plantas apomíticas e sexuais.

Cinquenta segmentos basais foram obtidos de plantas cultivadas *in vitro* e foram induzidos para embriogênese somática conforme descrito acima para sementes maduras. Os resultados foram observados depois de 60 dias em cultura.

-folhas jovens de plantas apomíticas e sexuais

Folhas jovens não expandidas de plantas apomíticas e sexuais cultivadas *in vitro* foram cultivadas usando o método modificado baseado em Ahmadabadi et al. (2007). Resumidamente, segmentos foliares da região basal de folhas jovens foram plaqueados em meio de indução de calos por 15, 20 ou 30 d, e depois transferidos para meio de indução de embriogênese. Sessenta explantes foram usados para cada tratamento, e dois experimentos independentes foram conduzidos.

Embriogênese somática repetitiva

Calos obtidos de sementes maduras em meio M1.3 em pH 5,8 foram subcultivados por 5 meses, a intervalos mensais e mantidos no escuro a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. A capacidade de regeneração dos calos foi verificada depois de dois e quatro meses, tendo uma parte sendo transferida para meio MS3.

Enraizamento de brotos

Para todos os experimentos, os brotos regenerados foram transferidos para meio de enraizamento, Meio B (BOURGIN; CHUPEAU; MISSONIER, 1979) e cultivados em câmara de crescimento sob fotoperíodo de 14 h e intensidade de luz de 35 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. As plantas com raízes foram transplantadas para sacos plásticos com vermiculita, e aclimatadas em casa de vegetação.

Microscopia de luz e eletrônica de varredura

Segmentos basais de plantas *in vitro* e calos embriogênicos obtidos de sementes maduras foram processados para microscopia de luz (ML) e eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram fixadas em paraformaldeído a 4% e desidratadas em séries graduais de etanol de 30% a 70% em intervalos de 30 min, e mantidas a 4 °C. Para ML, segmentos basais foram desidratados em série crescente de etanol até 100%, transferidos para propanol por 8 horas e para butanol durante a noite. Foi feita infiltração em Histo-resina (Leica, Heidelberg, Germany), a 4 °C, usando butanol: meio de infiltração (2:1, 1:1, 1:2). A infiltração foi completa em 100% de meio de infiltração num total de 48 h. A polimerização foi realizada em temperatura ambiente por 24 a 48 h. Seções seriadas (5 μm espessura) foram obtidas em micrótomo rotativo, colocadas em lâminas com uma gota de água, secas e coradas com azul de toluidina em água a 0,05% (p/v). Seções coradas foram preparadas com Entellan (Merck, Darmstadt, Germany) e cobertas com lamínula. As amostras foram analisadas e imagens obtidas com uma lente Zeiss Axioscop 40 HBO 50 A/C (Carl Zeiss, Jena, Germany). Para MEV, segmentos basais e calos embriogênicos de sementes maduras foram desidratados em série de etanol, secos ao ponto crítico com CO_2 , metalizados com ouro e observados com lente LEO 435 VP (Carl Zeiss, Jena, Germany), operando a 20 keV.

3.3 Resultados e Discussão

Plantas de *Brachiaria* cultivadas *in vitro* proporcionam uma fonte confiável de segmentos basais para micropropagação e são uma alternativa de fonte de explantes (PINHEIRO et al., 2000). Ensaios prévios para introdução *in vitro* usando a gema separada do nó caulinar não foram eficientes, não tendo havido desenvolvimento das mesmas (dados não apresentados). Cortando os nós em sentido longitudinal antes da desinfestação expõe-se o tecido vascular, evitando contaminação por endofíticos, observada quando nós intactos de plantas do campo foram usados (Figura 1.1 A), permitindo que plantas sejam introduzidas *in vitro* com sucesso. No meio de indução, com ou sem BAP, enquanto alguns explantes não apresentaram brotos, outros tiveram uma proliferação de multibrotações (Figura 1.1 B) originadas da área da coroa (Figura 1.1 C). Brotos induzidos foram isolados e desenvolvidos em plântulas em meio MMP (Figura 1.1 D). Quando usados segmentos basais de plantas cultivadas *in vitro*, a adição de 3 mg/L BAP para meio de indução de broto favoreceu multibrotações na planta sexual, assim como no genótipo apomítico. As percentagens de explantes com respostas à indução com ou sem BAP foram, respectivamente, 34% e 29% para apomítica e 27% e 32% para a sexual. No genótipo sexual uma média de 6,3 brotos por explante foi obtida em meio com BAP, um número quatro vezes maior que o observado em meio sem BAP. No genótipo apomítico, uma média de 5,8 brotos por explante foi observada em meio com BAP, três vezes maior que o obtido em meios sem BAP. Seções transversais histológicas de segmentos basais de plantas *in vitro* com ausência de hormônios, mostraram a presença de gemas pré-existentes (Figura 1.1 E, F).

Em segmentos basais cultivados *in vitro* por 10 dias na presença de citocininas, análise de MEV mostrou estrutura de bainha de folha protegendo o meristema apical do broto (Figura 1.1 G), semelhante ao coleóptilo do embrião da semente de monocotiledôneas. Os resultados indicam que brotos múltiplos ocorrem a partir de gema pré-existente, ao contrário de proliferação adventícia de gemas. Conseqüentemente, segmentos basais apesar de serem uma boa opção para micropropagação, especialmente para plantas com baixa produção de sementes, como o genótipo sexual de *B. brizantha*, e adequada para duplicação de cromossomos por colchicina (PINHEIRO et al., 2000), não são

convenientes para experimentos de transformação genética. A estratégia usada permitiu a introdução, caracterização e manutenção a longo prazo de *B. brizanthain vitro*.

Indução de organogênese em sementes maduras

Duas combinações de reguladores de crescimento de plantas, KIN/ANA (3:1) e BAP/ANA (3:0,3), foram testadas para indução de organogênese em sementes maduras de *B. brizantha* apomítica. Na combinação KIN/ANA, 54% dos explantes apresentaram um broto, com ausência de desenvolvimento de coleorriza, enquanto em 25% das sementes, dois brotos se desenvolveram (Tabela 1.2). Em *B. brizantha* cv. Marandu 8% das sementes apresentaram dois embriões (ALVES; CARNEIRO; ARAÚJO, 2001). A combinação de KIN/ANA favoreceu o aparecimento de dois brotos em 25% das sementes, uma porcentagem que é maior que os 8% observados *in natura*, indicando que a cinetina pode ter estimulado a formação de brotos. Calos friáveis foram observados em 11% dos explantes, na região do mesocótilo do embrião das sementes. Na combinação de BAP/ANA, 74% das sementes produziram somente um broto com crescimento de coleorriza; a presença de dois brotos ocorreu em 8% das sementes; 8% formaram pequenos calos friáveis, enquanto 9% formaram multibrotações na região do mesocótilo, no ponto de inserção entre o escutelo, coleóptilo e coleorriza no embrião de sementes de monocotiledôneas (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007). As multibrotações (Figura 1.1 H) foram separadas e os brotos enraizados.

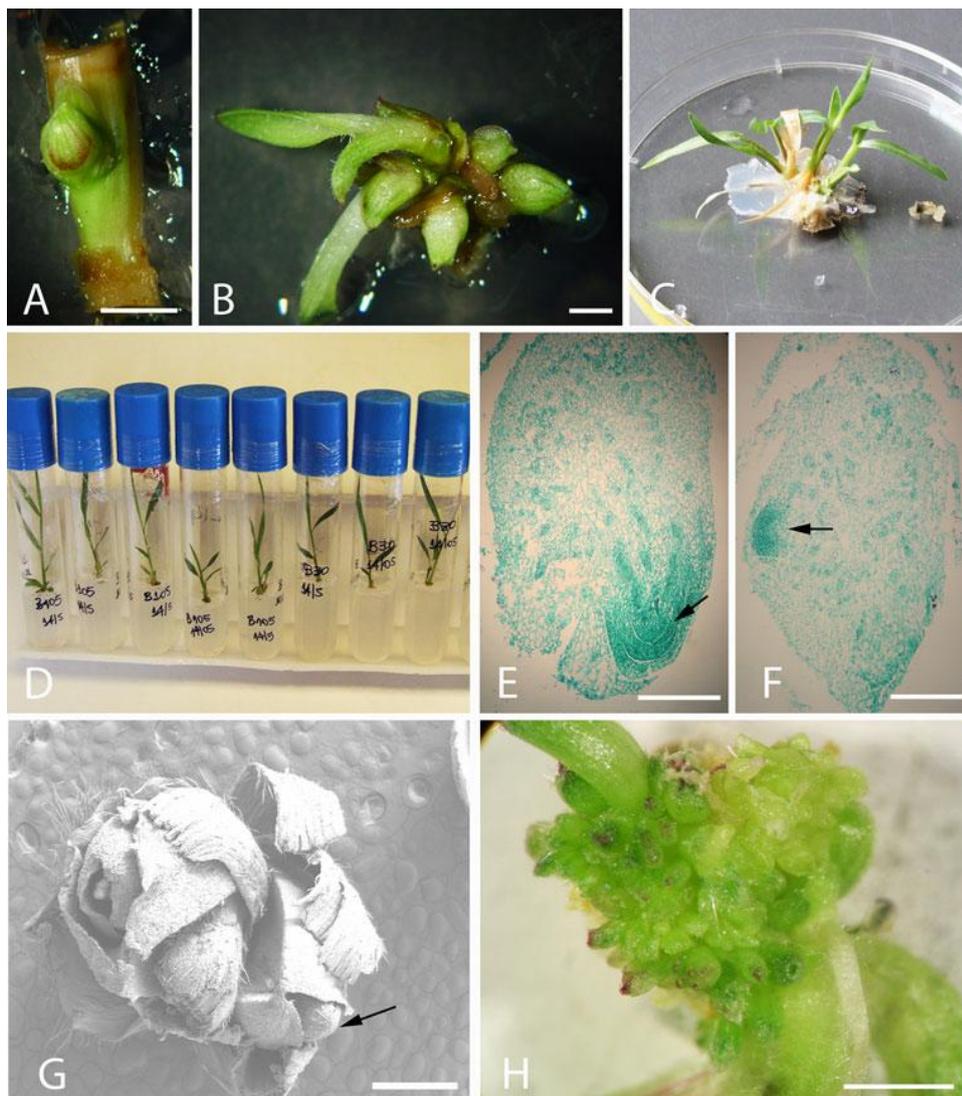


Figura 1.1 – Micropropagação e organogênese de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. (A) explante introduzido *in vitro* consistindo de nó caulinar de planta crescida no campo, cortado longitudinalmente (metade do nó), com gema lateral; (B, C) múltiplas gemas formadas de um explante, originando uma brotação em tufo; (D) coleção de plantas estabelecidas *in vitro*, usadas como fonte de explantes; (E, F) micrografia de luz de um segmento basal introduzido *in vitro* com uma gema (E, seta) e um primórdio de gema (F, seta) com células meristemáticas com citoplasmas densamente corados; (G) micrografia eletrônica de varredura de um segmento basal cultivado *in vitro* por 10 d, mostrando a estrutura do tipo bainha protegendo o meristema apical do broto (seta); (H) múltiplas gemas que se diferenciaram em semente madura cultivada em meio contendo BAP e ANA. Barras: A, B, G, H = 1 mm, E, F = 200 μ m

A região do mesocótilo em *Brachiaria* parece ser capaz de formar multibrotações. Da mesma forma, no trigo, na região em torno do embrião zigótico, um anel de células é capaz de produzir múltiplas gemas (FISCHER et al., 1997). Esta região parece ser responsiva a citocininas em outras plantas como *Lotus corniculatus* (NIKOLIĆ et al., 2006), *Pogonatherum paniceum* (WANG et al., 2008), *Quercus robur* (MARTÍNEZ et al., 2008) *Sorghum* and *Trypsacum* (SAIRAM et al., 2002, 2005) para as quais multibrotações também foram obtidas. Nossos resultados revelaram um potencial morfogênico de sementes maduras para organogênese em *B. brizantha*.

Tabela 1.2 – Resposta morfogênica de sementes maduras de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu a diferentes combinações de hormônios

Resposta morfogênica	Composição hormonal dos meios	
	KIN3:ANA1	BAP3:ANA0,3
Semente com 1 broto	54 ± 4,24	73,5 ± 2,12
Semente com 2 brotos	24,5 ± 0,07	7,5 ± 0,70
Sementes com calos	11 ± 4,24	8 ± 1,41
Sementes com gemas	0	9 ± 1,41

Cem sementes foram usadas por tratamento e dois experimentos independentes foram realizados.

Indução de embriogênese somática em sementes maduras

Sementes maduras cultivadas por cinco dias em meio de indução de calos apresentaram um intumescimento no escutelo, definindo o eixo embrionário (Figura 1.2 A). O intumescimento foi seguido por uma proliferação de calos friáveis na superfície do escutelo, e uma estrutura branca e opaca foi observada (Figura 1.2 B). Esta estrutura é um escutelo diferenciado de embrião somático (Figura 1.2 C) que produz novos escutelos repetitivamente. Um detalhe da superfície do calo mostrou coleóptilo envolvendo o meristema apical de embriões somáticos; cada coleóptilo contém um meristema apical (Figura 1.2 D). Vários estádios de diferenciação de embrião somático foram identificados pela presença de proembriões, tipicamente caracterizados por estrutura globular mostrando pequenas células meristemáticas, e embriões somáticos bem desenvolvidos com feixes vasculares, mostrando a polaridade do eixo

embrionário (Figura 1.2 E). Explantes com quatro semanas de idade apresentaram uma cor creme perolada, característica do eixo embrionário, que apresentava-se envelopado por uma estrutura de cor branca opaca, isolada, sendo o escutelo bem diferenciado. E em alguns casos este apresentou-se na forma de escutelos fundidos (Figura 1.2 F, G). Outra característica identificada foi vários eixos embrionários presentes num mesmo escutelo (Figura 1.2 H). Dois padrões de regeneração foram observados depois de transferir os explantes para meio de regeneração- múltiplos brotos produzidos por múltiplos eixos embrionários fundidos (Figura 1.2 I) e uma plântula completa originada de embriões somáticos isolados. Sob condição de iluminação, uma pigmentação roxa foi observada na ponta das folhas dos brotos.

O desenvolvimento de embriões somáticos tem sido demonstrado em muitas monocotiledôneas como *Pennisetum glaucum* (VASIL; VASIL, 1980), *Zea mays* (LU; VASIL; VASIL, 1983), *Paspalum scrobiculatum* (VIKRANT; RASHID, 2003), *Paspalum simplex* (MOLINARI et al., 2003), *Hordeum vulgare* (LI et al., 2009) e *Cenchrus ciliaris* (YADAV et al., 2009), e na maioria das vezes os embriões primários foram formados indiretamente via calos. Em *B. brizantha*, embriões somáticos desenvolveram de forma similar aos embriões apomíticos de sementes como observado por Lenis-Manzano et al. (2010).

Neste trabalho, apesar das características comuns dos embriões das sementes de monocotiledôneas, várias outras características encontradas durante o desenvolvimento de embriões somáticos são demonstradas. Os embriões somáticos apresentam um escutelo distinto (cotilédone) envelopando o eixo do embrião onde o coleóptilo é uma bainha tubular típica que protege o meristema apical do embrião com um poro terminal. O meristema apical do embrião está localizado no terminal aberto do escutelo, e o meristema da raiz na parte terminal fechada formando o eixo embrionário. O padrão de escutelos fundidos e poliembriões descrito aqui como o resultado de indução de embriogênese somática é similar ao reportado para embrião zigótico de trigo, como o resultado de um efeito de acúmulo de 2,4-D nas células (FISCHER et al., 1997). Snow e Snow (1937) observaram que a divisão de partes embriônicas pode ser devido ao acúmulo local de auxina. Quando o suprimento de auxina decresce, ocorre a diferenciação em embriões, e diferentes modelos de distribuição no mesmo explante pode ocorrer devido ao acúmulo local de auxina.

O transporte e acúmulo de auxina podem também ter influência na diferenciação de embriões somáticos em *Brachiaria*.

Ahmed et al. (2009) mostraram acúmulo de antocianina nas células epidérmicas de coleóptilos de trigo germinadas sob luz branca, sugerindo que a luz é um dos mais importantes estimuladores ambientais que regulam acúmulo de antocianina. Além disso, eles demonstraram que a biossíntese de antocianina é tecido específica e altamente conservada entre espécies de plantas. A pigmentação roxa observada em gemas e brotos cultivados sob condição de luz indicaram uma produção de antocianina induzida por estresse nas pontas das folhas de *B. brizantha* cultivadas *in vitro*.

A resposta morfogênica de sementes maduras em culturas usando 3 combinações de meios para indução de calos e regeneração de brotos é mostrada na Tabela 1.3. A combinação de dois meios M1/MS1 e M1.2/MS2 apresentaram baixa percentagem de sementes com calos embriogênicos, bem como a baixa percentagem de sementes que formaram brotos, quando comparados com a combinação de meios M1.3/MS3. A maioria dos calos em meio M1/MS1 produziram 1 ou 2 brotos por explante, enquanto em outros meios múltiplas brotações foram obtidas por explante. O meio M1.3 produziu a maior percentagem de calos embriogênicos (77%) em uma concentração intermediária de 2,4-D. A combinação dos meios M1.3/MS3 produziu regeneração de plantas em mais de 54% das sementes induzidas.

Tabela 1.3 – Efeito da combinação de meios na embriogênese somática em sementes maduras de *Brachiaria brizantha* cultivadas por dois meses

Combinação de meios	Nº total de sementes	% sementes com calos embriogênicos \pm DP	% sementes que formaram brotos \pm DP
M1/MS1	320	56,25 \pm 16,56	22 \pm 9,27*
M1.2/MS2	470	64,2 \pm 23,32	38 \pm 22,50**
M1.3/MS3	365	77,25 \pm 9,74	54,25 \pm 19,75**

As médias foram obtidas de quatro experimentos independentes.* presença de 1 or 2 brotos/explante.** presença de tufo de brotos/explante

Em relato anterior, 67% dos embriões isolados de sementes maduras de *Brachiaria* resultaram em calos embriogênicos quando cultivados em combinação dos meios M1.2/MS2 (SILVEIRA et al., 2003). Em ginseng, é

necessária a excisão do embrião zigótico maduro para indução de embriogênese somática (CHOI; SOH, 1996). Neste estudo, usando a mesma combinação de meios M1.2/MS2 e sementes maduras intactas, foi obtida uma percentagem similar (64%) de sementes com calos embriogênicos. Este resultado indica que em *B. brizantha* a excisão de embriões de sementes não é requerida para indução de embriogênese somática, tornando isto um método simples e rápido. Em tecidos de plantas cultivadas é recomendado trabalhar com baixo nível de hormônio para reduzir variação somaclonal. M1.3 tem uma concentração intermediária de 2,4-D e MS3, uma baixa concentração de citocinina, comparado com outros meios testados, e foram a melhor combinação para indução de calos embriogênicos e regeneração de brotos a partir de sementes.

A combinação de meios M1.3/MS3 foi usada para testar o efeito do pH ácido. A Tabela 1.4 apresenta o efeito do pH na regeneração de plantas em calos embriogênicos. Três tipos de tufo foram observados de acordo com o número de brotos apresentados em cada grupo: tufo com um a cinco brotos, cinco a dez brotos e com mais de 10 gemas e brotos. Diferentes tipos de tufo ou mais de um tipo pode estar presente em um calo embriogênico. Para todas as 3 categorias de tufo, em pH 4,0 a frequência de cada tipo aumentou quando comparado com pH 5,8. Além disso, a contaminação por bactéria endógena foi reduzida em pH 4. As plântulas regeneradas em ambos pH eram verdes e morfologicamente normais (Figura 1.2 J). O pH intracelular é importante para a atividade enzimática e o pH fisiológico fica entre 7,4-7,5 em células de plantas (GOUT et al., 2001). Alguns estudos têm demonstrado poderosos mecanismos de regulação de pH em células de plantas. Guern et al. (1986) mostraram, em células de *Acer pseudoplatanus* cultivadas em meio líquido, onde a carga de ácido induziu uma forte acidificação inicial do citoplasma, que depois o pH aumentou rapidamente. Oscilações no pH parecem ser importantes no controle do ciclo das células e na capacidade de proliferação das mesmas (revisado por MADSHUS, 1988).

Neste trabalho, em *Brachiaria*, reduzindo o pH na combinação de meios M1.3/MS3 de pH 5,8 para pH 4 foi observado o aumento do número de calos embriogênicos que formou brotos em meio de regeneração, assim como, o número de brotos em cada explante. Além disso, o pH ácido foi mostrado incrementar a recuperação de brotos de calos embriogênicos. De modo geral, a

resposta embriogênica das sementes maduras de *B. brizantha* para cultura foi muito rápida e dessincronizada, explantes com dez dias de cultura já continham escutelos diferenciados.

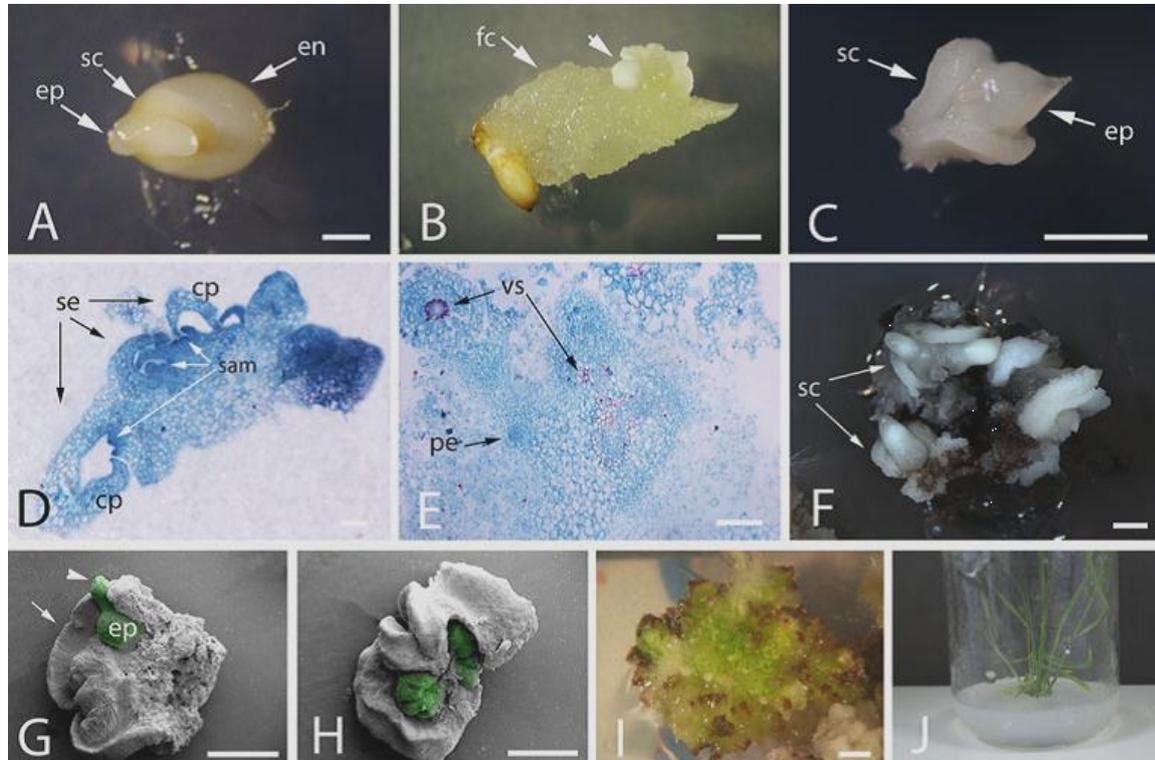


Figura 1.2 – Embriogênese somática de sementes maduras de *Brachiaria brizantha*. (A) explante cultivado por 5 d em meio de indução de calos mostrando intumescimento do eixo embrionário do embrião apomítico da semente; (B) explantes cultivados por 10 d meio de indução de calos mostrando proliferação de calos friáveis a partir do escutelo do embrião apomítico com estruturas brancas e opacas (cabeça de seta); (C) detalhe de um embrião somático isolado e seu escutelo bem diferenciado; (D, E) longitudinal, D, e transversal, E, micrografia de luz de calos embriogênicos mostrando em D vários embriões somáticos com seus meristemas apicais envelopados por seus coleóptilos, e em E feixes vasculares e um proembrião; (F) embrião somático na forma de torpedo após 30 d no meio de indução; (G, H) micrografia eletrônica de varredura de embriões somáticos mostrando em G escutelos fusionados (seta), eixo embrionário colorido em verde, e poro do coleóptilo (cabeça de seta) e em H um escutelo bem desenvolvido com vários eixos embrionários formando poliembriões, colorido em verde; (I) primórdio de broto desenvolvido de embriões somáticos após sua transferência para meio de regeneração; (J) Planta obtida de embriogênese somática. ep = eixo embrionário, sc = escutelo, en = endosperma, fc = calos friáveis, se = embrião somático, cp = coleóptilo, vs = feixe vascular, sam = meristema apical de broto, pe = proembrião. Barras: A, B, C, F, G, H = 1 mm, D, E = 200 μ m

Tabela 1.4 - Efeito do pH na regeneração de gemas em calos embriogênicos obtidos de sementes maduras na combinação de meio M1.3/MS3

Tratamento	Tipo de tufos	média + DP	Número total de explantes
pH 4,0	1-5	151±19	195
	6-10	94±31	
	>10	95±31	
pH 5,8	1-5	72±17	189
	6-10	28±3	
	>10	25±16	

O valor da média é a média do número de ocorrências de cada tipo de tufos de brotos (frequência) em três diferentes experimentos no meio de regeneração. Tipos de tufos de brotos refere-se ao número de gemas ou brotos encontrados em um agregado. Eles foram agrupados em três tipos de tufos: de um a cinco, de seis a dez e com mais de 10 gemas ou brotos

Indução de embriogênese somática em segmentos basais

Respostas morfogênicas de segmentos basais de plantas apomíticas e sexuais crescidas *in vitro* e cultivados em combinação de 3 meios foram mostradas na Tabela 1.5. Além disso, menos de 5% dos explantes oxidaram e não formaram calos. A exceção foi o genótipo sexual, que na combinação de meios M1.2/MS2, mais de 20% dos explantes oxidaram e 10% formaram calos friáveis nas três combinações de meios. Calos friáveis que produziram raízes contaram como a maioria da resposta morfogênica, chegando até 58% na combinação de meios M1.2/MS2. Uma maior percentagem de segmentos basais com calos embriogênicos foi observada na combinação de meios M1/MS1 (27%), mas menos de 5% produziram brotos. Menos de 10% dos explantes produziram calos embriogênicos com ou sem brotos em M1.2/MS2, e entre 12 e 20% dos explantes tiveram resposta embriogênica na combinação de meios M1.3/MS3. Explantes do genótipo apomítico apresentaram menor percentagem de calos friáveis com raízes comparado com o genótipo sexual, nas três combinações de meios. Em contraste, um incremento percentual de calos embriogênicos com brotos, 20% em M1/MS1, 35% em M1.2/MS2 e mais de 65% em M1.3/MS3 foi observado. Para os genótipos apomíticos, calos embriogênicos

associados com calos friáveis foram observados em 15% e 13% dos explantes em M1.2/MS2 e M1.3/MS3, respectivamente. Resultados similares foram observados para o genótipo sexual na combinação de meios M1.3/MS3, que foi conseqüentemente a melhor combinação para formação de brotos. As plântulas recuperadas foram enraizadas e apresentaram aparência normal e desenvolvida.

Table 1.5 - Resposta morfogênica de segmentos basais de genótipos sexual e apomítico de *Brachiaria brizantha* cultivados *in vitro* em diferentes combinações de meios, dada em média percentual de explantes que mostraram uma das respostas: calos friáveis, calos friáveis com raízes, calos friáveis com calos embriogênicos ou calos embriogênicos com brotos

Resposta morfogênica	Genótipo sexual			Genótipo apomítico		
	M1/MS1	M1.2/MS2	M1.3/MS3	M1/MS1	M1.2/MS2	M1.3/MS3
calos friáveis	12 ± 1,7	12,5 ± 0,9	14,6 ± 1,5	8,1 ± 4,8	4,1 ± 1,9	16,8 ± 3,7
calos friáveis/raízes	56 ± 6,8	57,9 ± 8,6	47,4 ± 4,9	67,7 ± 6,8	42,4 ± 7,6	1,8 ± 0,6
calos friáveis/calos embriogênicos	27 ± 3,2	3,4 ± 1,6	13,3 ± 2,4	2,3 ± 1,0	15,3 ± 4,3	13,4 ± 1,6
calos embriog/brotos	3 ± 1,3	4,3 ± 1,1	21,5 ± 2,7	21,9 ± 7,9	35,3 ± 3,8	64,4 ± 12,1

Média de 50 explantes por tratamento em dois experimentos

A combinação de meio M1.3/MS3 deu o melhor resultado para a formação de brotos em ambos genótipos, apesar da percentagem do genótipo apomítico ter sido maior. Diferenças de respostas entre os genótipos apomítico e sexual indicam que a resposta morfogênica em *B. brizantha* parece ser dependente do genótipo. Em outras gramíneas como *Cenchrus ciliaris*, também foi relatada uma resposta genótipo-dependente entre apomítico e sexual (YADAV et al., 2009). Contudo, os genótipos diferem não apenas quanto à sua resposta morfogênica a diferentes meios de cultura, mas também em suas interações com o meio durante o crescimento (KHANNA; RAINA, 1998; Dai et al., 2011). Em *Brachiaria*, similarmente ao que foi observado em Zoysiagrass (LI et al., 2010), as regiões meristemáticas presentes nos segmentos basais foram talvez as responsáveis pela proliferação de calos sob efeito de 2,4-D e BAP, que eventualmente tornaram-se embriogênicas e regeneraram brotos. Um sistema de embriogênese somática baseado no uso de segmentos basais foi desenvolvido para ambos os genótipos, sexual e apomítico. Especificamente para o genótipo sexual este sistema é uma alternativa ao uso de sementes, uma vez que este genótipo não

produz sementes de uma forma regular, como seria o esperado para um genótipo sexual.

Embriogênese somática a partir de folhas jovens

A Tabela 1.6 sumariza as respostas morfogênicas observadas da cultura de segmentos de folhas obtidas da região basal de folhas jovens não expandidas. Os resultados foram altamente variáveis e nenhuma tendência pode ser observada entre os genótipos sexual e apomítico, ou como resultado do aumento no período de indução ou alteração de pH. Explantes na indução de calos apresentaram uma elevada oxidação e uma baixa taxa de formação de calos foi obtida (Figura 1.3 A). Quando os calos foram transferidos para meio de regeneração produziram apenas raízes (Figura 1.3 B), sem desenvolvimento de embrião em todos os tratamentos testados.

Tabela 1.6 – Respostas morfogênicas de segmentos foliares de plantas de *Brachiaria brizantha* cultivadas *in vitro* sob diferentes condições de tempo de indução, genótipos e pH

Tratamentos		Calos induzidos % Média ± DP		Número total de explantes em REG		Explantes com calos ou raízes* % Média ± DP		Calo com broto
Dias de indução	Genótipo	pH						
		4	5,8	4	5,8	4	5,8	
15 d	apomítico	11,3±0,5	12,5±0,8	48	104	17±4,5	22±8	0
	sexual	17,5±5,9	16,7±3,4	66	71	30±3	14±1	0
20 d	apomítico	10±5	5,3±1,72	88	68	23±8,5	15±5	0
	sexual	0,2±0,1	23,8±1,3	88	90	03±2	21±3	0
30 d	apomítico	12,5±1,3	8,8±0	50	69	10±3	13±4,5	0
	sexual	24,9±24,9	10,7±0,7	58	125	19±2	12±3,5	0

Média de dois experimentos.

Em várias espécies de monocotiledôneas, a regeneração de calos derivada de tecidos vegetativos verdes parece ser extremamente recalcitrante, e poucas plântulas foram obtidas (CHAUDHURY; QU, 2000). Contudo, em *Echinochloa colona* (SAMANTARAY; ROUT; DAS, 1997), milho (AHMADABADI; RUF; BOCK, 2007) e em cevada (LI et al., 2009) foram relatadas regeneração eficiente nessas espécies usando a base de folhas jovens. Além

dessas, dois genótipos de *Viburnum dentatum*, que é um arbusto usado como ornamental, regenerou brotos quando tecidos de folhas foram cultivados no meio de plantas arbóreas (WPM) suplementado com BAP ou TDZ (DAI et al., 2011). Usando o mesmo sistema de milho em *B. brizantha*, apesar dos calos terem apresentado um aspecto embriogênico, não foi possível regenerar qualquer broto nas condições testadas, e apenas raízes proliferaram profusamente. Foi reportado que células meristemáticas de cereais e gramíneas diferenciam-se rapidamente, perdendo sua capacidade de manter-se em divisão no meio de cultura sem auxina em concentração adequada. É possível que o nível de auxina no meio usado não tenha sido adequado para promover embriogênese somática e tenha resultado na indução e proliferação de raízes. Por outro lado, mudanças no nível endógeno de hormônios podem estar envolvidos na diferenciação e competência embriogênica (revisado por SAIRAM et al., 2005; VASIL, 2005). Outros estudos seriam necessários para definir as condições ótimas para uma resposta embriogênica dos segmentos basais de folhas.

Embriogênese somática repetitiva

Calos embriogênicos subcultivados em intervalos mensais, por cinco meses, eram compostos de calos friáveis com estruturas compactas e nodulares na superfície dos calos (Figura 1.3 C). Esta estrutura nodular se desenvolveu em estruturas semelhantes a escutelos (Figura 1.3 D), semelhantes aos reportados em cereais e outras gramíneas (VASIL; VASIL, 1980, 1982; OZIAS-AKINS; VASIL, 1982, 1983). Essas estruturas geraram escutelos bem definidos, cada um com um eixo embrionário, numa maneira homogênea e sincronizada. Subcultivos dos calos no meio de regeneração por dois ou quatro meses resultaram no desenvolvimento normal e anormal de embriões, que levaram aproximadamente 80 dias para germinar. Essas culturas de quatro meses originaram apenas plântulas albinas.

A manutenção de células embriogênicas de monocotiledôneas em altos níveis de 2,4-D, por subculturas regulares em meio fresco, pode mantê-las perpetuamente no estado (embriogênico) meristemático (VASIL, 2005).

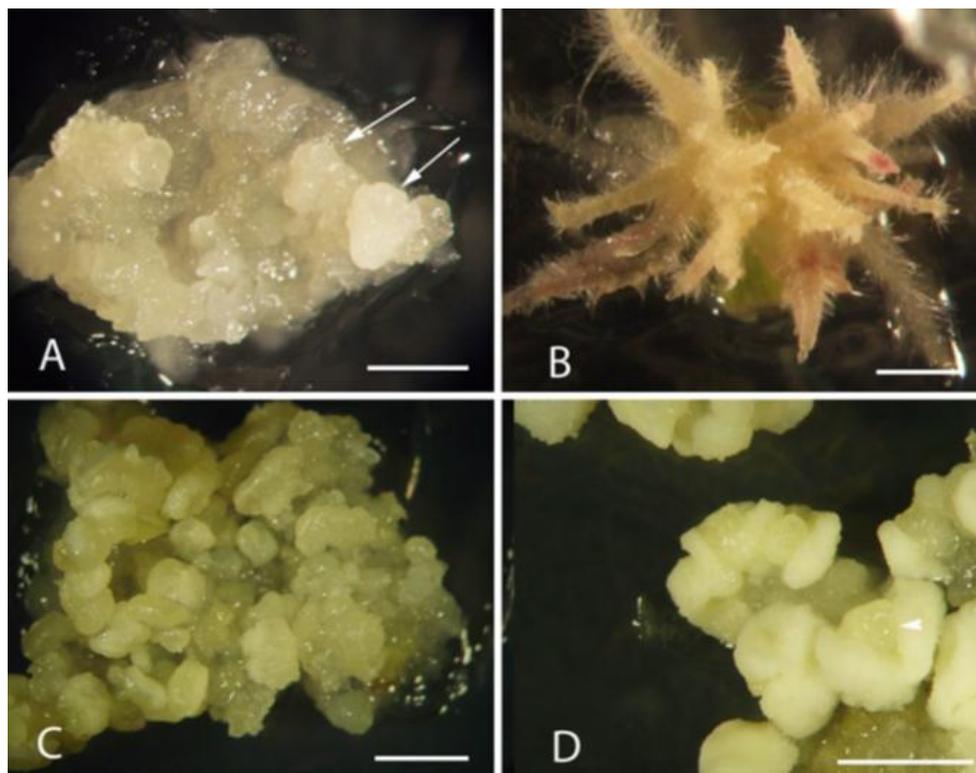


Figura 1.3 - Resposta morfogênica de segmentos de folhas jovens de plantas cultivadas *in vitro*, A e B, e de embriogênese repetitiva, C e D. (A) calos obtido do genótipo apomítico após 15 d de indução e 30 d no meio de regeneração, pH 5,8 com estruturas globulares semelhantes a calos embriogênicos, na superfície do calo (setas); (B) explante do genótipo sexual após 15 d na indução e 30 d no meio de regeneração, pH 5,8 com proliferação de raízes. (C) calos friáveis proliferando estruturas compactas e nodulares. (D) diferenciação sincronizada de embriões somáticos mostrando o poro do coleótilo (cabeça de seta). Barras=1mm

Apesar de ter sido evidente a possibilidade da embriogênese repetitiva em culturas embriogênicas de *B. brizantha*, a tendência ao albinismo pode impossibilitar uma cultura a longo prazo para esta espécie. Cevada, uma outra monocotiledônea, é altamente predisposta a variação somaclonal causada pela cultura *in vitro* (CHO; JIANG; LEMAUX, 1998; CHOI; LEMAUX; CHO, 2000). Células transgênicas e não transgênicas de cevada, da maioria dos genótipos, frequentemente não se diferenciaram em plantas ou apenas plantas albinas foram obtidas (para revisão ler LEMAUX et al., 1999).

Vários fatores são conhecidos por afetarem a estabilidade cromossômica e induzirem mudanças ectópicas nos tecidos vegetais durante o crescimento *in vitro*, tais como, espécie, genótipo, nível inicial de ploidia, fonte de explantes, composição do meio, reguladores de crescimento usados e período em cultura (CONSTANTIN, 1981; KARP, 1991; BREGITZER; CAMPBELL, 2001). Além

disso, cultura de tecidos prolongada, especialmente no caso de embriogênese somática, foi relatada como ocorrendo mobilização de elementos transponíveis. Neste contexto, a ativação dos elementos transponíveis tem sido responsabilizada como a maior fonte de variação somaclonal (HIROCHIKA et al., 1996; SAIRAM et al., 2002, 2005). Kowata et al. (1995) demonstraram que plântulas de arroz obtidas de calos induzidos e mantidos por um mês eram verdes, enquanto que as obtidas de calos de 11 meses eram albinas em 100% dos casos. Somado a isto, Artunduaga et al. (1988) testaram três variedades de grama Bermuda e obtiveram 90% de plantas albinas. Em dois mutantes de bambu (*Bambusa edulis*) derivados de micropropagação, a caracterização dos genomas de seus cloroplastos demonstrou aberrações, causando a redução ou ausência de tilacóides, e acumulando lipídios em plastoglóbulos, que são subcompartimentos de lipoproteínas que estão permanentemente acoplados às membranas tilacóides (LIU et al., 2007).

B. brizantha parece ser sensível à exposição a longo prazo ao 2,4-D em culturas, possivelmente o responsável pela alta frequência de albinismo observada nesta espécie em culturas de calos embriogênicos de quatro meses. O uso de poliaminas para estimular a obtenção de plantas verdes tem sido sugerido por vários autores, mesmo para monocotiledôneas (CHIANCONE et al., 2006; REDHA; SULEMAN, 2010; GERMANÀ, 2011), e está sendo testado para *Brachiaria brizantha*.

3.4. Conclusões

- ✓ Foi mostrado pela primeira vez o potencial organogênico de sementes maduras de *B. brizantha*, além do potencial embriogênico.
- ✓ Foi obtido um sistema eficiente para micropropagação a longo prazo de plantas *in vitro* de *Brachiaria*.
- ✓ Foi mostrada, pela primeira vez, a caracterização morfológica detalhada da diversidade de respostas de embriogênese somática, desde calos friáveis até a regeneração de plantas de *B. brizantha*.
- ✓ Foi obtido um sistema alternativo ao uso de sementes maduras para embriogênese somática usando segmentos basais de plantas cultivadas *in vitro*, uma vez que o genótipo sexual é ineficiente para produzir sementes.
- ✓ Foi demonstrado que *B. brizantha* é sensível à indução de embriogênese somática a longo prazo, sendo necessária a redução do período da cultura *in vitro*.
- ✓ A melhoria na eficiência da embriogênese somática refletirá diretamente na eficiência da transformação genética.

Capítulo II: Regeneração de plantas de *Brachiaria brizantha* via unidades e suspensões celulares embriogênicas

Resumo

A possibilidade de obtenção de embriogênese somática ou organogênese a partir de células, tecidos e órgãos vegetais *in vitro* tem gerado numerosas aplicações nos estudos de desenvolvimento e de transformação genética de plantas. Em monocotiledôneas, especialmente nas espécies de gramíneas, a regeneração de plântulas foi obtida principalmente através de embriogênese somática. Evidências de mais de uma resposta morfogênica no mesmo tipo de explante sob condições de diferentes concentrações e proporções de auxinas:citocininas foram observadas em algumas espécies. Em *Brachiaria brizantha* cv. Marandu relatou-se a obtenção de calos embriogênicos a partir do de semente ou embrião isolado da semente e formação de multibrotações a partir de segmentos basais. No entanto, esta planta ainda é considerada recalcitrante à cultura de tecidos, e métodos eficientes associados com os sistemas de transformação genética ainda são escassos na literatura. O objetivo deste estudo foi estabelecer metodologias para obtenção de unidades embriogênicas e suspensões celulares embriogênicas de *B. brizantha*. Diversas combinações de meios de indução de embriogênese somática e de regeneração foram testadas. Foram realizadas análises de microscopia eletrônica de varredura e de microscopia de luz das unidades embriogênicas obtidas, tendo resultado na caracterização morfoanatômica de três diferentes estádios de desenvolvimento. Foram obtidas combinações de meios mais adequadas para indução a partir de calos, manutenção do potencial embriogênico e regeneração de plantas a partir das suspensões celulares obtidas. Este trabalho é pioneiro na obtenção de unidades embriogênicas e suspensões celulares embriogênicas de *Brachiaria*, dois sistemas eficientes para regeneração *in vitro*.

Palavras-chave: Microscopia eletrônica de varredura. microscopia de luz. desenvolvimento do embrião somático de monocotiledônea. cultura *in vitro*.

Abstract

The possibility of induction of somatic embryogenesis or organogenesis from plant cells, tissues and organs *in vitro* generates numerous applications in developmental studies and genetic transformation. In monocots, especially in grass species, regeneration of plantlets was obtained primarily through somatic embryogenesis. Evidences of simultaneous development of somatic embryos and adventitious buds from the same explant under the control of different concentrations of auxin:cytokinins have been reported in different species. In *Brachiaria brizantha* cv. Marandu embryogenic callus induced from isolated zygotic embryo and multiple shoot formation from basal segments. However, this species is still considered recalcitrant to tissue culture, and efficient methods associated with the genetic transformation systems are scarce in the literature. The objective of this study was to establish methodologies for obtaining embryogenic units and embryogenic cell suspensions. Several combinations of medium for somatic embryogenesis induction and regeneration were tested. Microscopical analyses of the embryogenic units were carried out, resulting in morphoanatomical characterization of three different developmental stages. Media combinations for most suitable callus induction, maintenance of embryogenic potential and plant regeneration from embryogenic cell suspensions were achieved. This work is pioneer in obtaining embryogenic aggregates and embryogenic cell suspensions in *Brachiaria*, both systems efficient for *in vitro* regeneration.

Keywords: Scanning Electron Microscopy. light microscopy. monocot somatic embryo development. *in vitro* culture.

4.1 Introdução

A embriogênese em plantas não ocorre apenas a partir do processo de fertilização, pois muitas espécies de dicotiledôneas e monocotiledôneas se reproduzem assexuadamente por apomixia (KOLTUNOW; GROSSNIKLAUS, 2003), como ocorre na maioria das espécies de gramíneas do gênero *Brachiaria* (VALLE; SAVIDAN, 1996; FELISMINO et al., 2012). Embriões podem também desenvolver-se ectopicamente, num processo que ocorre naturalmente em espécies epífilas (CHIAPPETTA et al., 2009). Além disso, células gametofíticas e somáticas podem ser cultivadas *in vitro* para a indução do desenvolvimento embrionário de forma direta ou indireta. Embora embriões zigóticos, apomíticos e somáticos possam se desenvolver a partir de diferentes tecidos e de poderem ser ativados por diferentes sinais, é provável que em fase precoce, todos dependam da mesma via de sinalização (KOLTUNOW; GROSSNIKLAUS, 2003; TUCKER et al., 2003). Isto é consistente com a expressão de genes *SERK* (Somatic embryo receptor-like kinase) na iniciação de embriões zigóticos e somáticos (HECHT; VIELLE-CALZADA; HARTOG, 2001; KOEHLER, 2010), e de embriões que se desenvolvem a partir de oosfera não reduzida (DUSI, 2001), bem como, no desenvolvimento de sacos embrionários de tecido nucelar em espécies apomíticas (ALBERTINI et al., 2005).

Em monocotiledôneas, especialmente nas espécies de gramíneas, a regeneração de plântulas foi obtida principalmente através de embriogênese somática (VASIL; VASIL, 1980, 1982; Vasil, 2005). Evidências de mais de uma resposta morfogênica no mesmo explante sob o controle de diferentes concentrações e proporções de auxinas:citocininas foram observadas em espécies da família Poaceae como sorgo, painço, cana-de-açúcar e *Pogonatherum paniceum* (revisado por WANG et al., 2008).

A embriogênese somática em *B. brizantha* é influenciada por diversos fatores tais como genótipo, tipo de explante e condições de cultura (CABRAL et al., 2011). Os relatos de cultura de tecidos de *Brachiaria* na literatura consistem primeiramente da indução de calos e regeneração de plantas utilizando-se sementes de *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. ruziziensis* e *B. dictyoneura* como explantes iniciais (TOHME et al., 1996). Posteriormente, usando a mesma

metodologia, calos foram induzidos a partir de embriões isolados de sementes em 76% dos explantes de *B. brizantha* (LENIS-MANZANO, 1998). A formação de multibrotações e embriões somáticos a partir de meristema apical foi demonstrada para *B. ruziziensis* (ISHIGAKI et al., 2009a). Esse sistema utilizou sementes maduras como explantes, apresentando baixa eficiência de regeneração, com o uso de 4 mg/L de 2,4-D, com um máximo de 21% e 17% de explantes apresentando multibrotações e embriogênese somática, respectivamente. Este sistema de multibrotações foi utilizado com sucesso, na duplicação *in vitro* de cromossomos de *B. ruziziensis* utilizando colchicina (ISHIGAKI et al., 2009b) e para transformação genética via biobalística (ISHIGAKI et al., 2012).

Em *B. brizantha* cv. Marandu relatou-se a obtenção de calos embriogênicos a partir do embrião isolado da semente em 73% dos explantes, enquanto 67% dos calos embriogênicos regeneraram plantas (SILVEIRA et al., 2003). Mais recentemente, a histologia do embrião isolado da semente cultivada *in vitro* foi mostrada (LENIS-MANZANO et al., 2010). A formação de multibrotações foi relatada em cultura de segmentos basais de plântulas micropropagadas desta cultivar (PINHEIRO et al., 2000), sendo este sistema eficiente para duplicação cromossômica *in vitro* de espécies de *Brachiaria*. No entanto, *B. brizantha* ainda é considerada recalcitrante à cultura de tecidos, e métodos eficientes associados com os sistemas de transformação genética ainda são escassos na literatura.

Em milheto (TAYLOR; VASIL, 1991), mandioca (SCHÖPKE et al., 1996; TAYLOR et al., 2001) e em *Quercus suber* (PUIGDERRAJOLS; MIR; MOLINAS, 2001) o desenvolvimento de embriões somáticos se dá pela rediferenciação de células epidérmicas e subepidérmicas que se proliferam dando origem a uma massa esférica, compacta, nodular e convoluta formada por um complexo proembriogênico definido como unidade embriogênica (UE). Essa massa compacta de proliferação de células meristemáticas, ou unidade embriogênica, precede a formação de embriões secundários, mas não é considerada como um calo verdadeiro por apresentar um certo grau de organização do tecido, sendo capaz de se proliferar indeterminadamente como geralmente ocorre na proliferação de calos. Desta forma, as células nas UE são consideradas como

células pré-determinadas embriogenicamente, ou seja, competentes para a embriogênese somática.

Uma elevada taxa de divisão celular nos explantes usados para transformação genética de monocotiledôneas é considerada um pré-requisito para que a integração do DNA exógeno ocorra (HIEI; KOMARI; KUBO, 1997; VASIL, 2005), e a rápida proliferação celular é uma característica de suspensões celulares. Sendo assim, suspensões celulares (SC) embriogênicas podem ser uma das melhores fontes de explantes para obtenção de plantas transgênicas em monocotiledôneas.

O objetivo deste estudo foi caracterizar o processo de embriogênese somática em *B. brizantha* a partir de unidades embriogênicas (UE) e suspensões celulares (SC) embriogênicas em diversas condições de cultivo, para obter um sistema eficiente de regeneração para transformação genética desta espécie.

4.2 Material e Métodos

Material Vegetal

Sementes maduras de *B. brizantha* cv. Marandu (BRA000591) foram gentilmente cedidas pela Embrapa Gado de Corte. As sementes foram descascadas e imersas em etanol 70% (v/v), por 5 min, e em seguida em solução contendo hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) e três gotas de Tween™ 20, por 30 min, sob agitação. Após esta etapa, as sementes foram lavadas seis vezes em água destilada autoclavada e em seguida colocadas sobre papel filtro.

Indução de calos para obtenção de unidades embriogênicas

Quatrocentas sementes foram inoculadas em um dos seguintes meios de indução: M1.3 pH 4, NB pH 5,8 ou NBBAP (meio NB suplementado com 0,2 mg/L de BAP) pH 4 ou 5,8 (Tabela 2.1), em placas de Petri (12 sementes por placa). As placas foram mantidas no escuro a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 4 semanas. Após este período, unidades embriogênicas (UE) foram identificadas e isoladas dos calos,

com o auxílio de estereomicroscópio e inoculadas em placas de Petri contendo o respectivo meio de indução, de 30 a 50 UE por placa, enquanto os calos restantes foram transferidos para os meios de regeneração, MS3 ou NBreg (Tabela 2.1). Após dez dias, metade das UE foram transferidas para meios de regeneração (MS3 ou NBreg) e a outra metade para meio de pré-regeneração, para depois de oito dias serem transferidas para os meios MS3 ou NBreg (Esquema 2.1).

Tabela 2.1 - Meios de cultura utilizados para indução e regeneração de calos embriogênicos, unidades embriogênicas e suspensão celular de *Brachiaria brizantha*

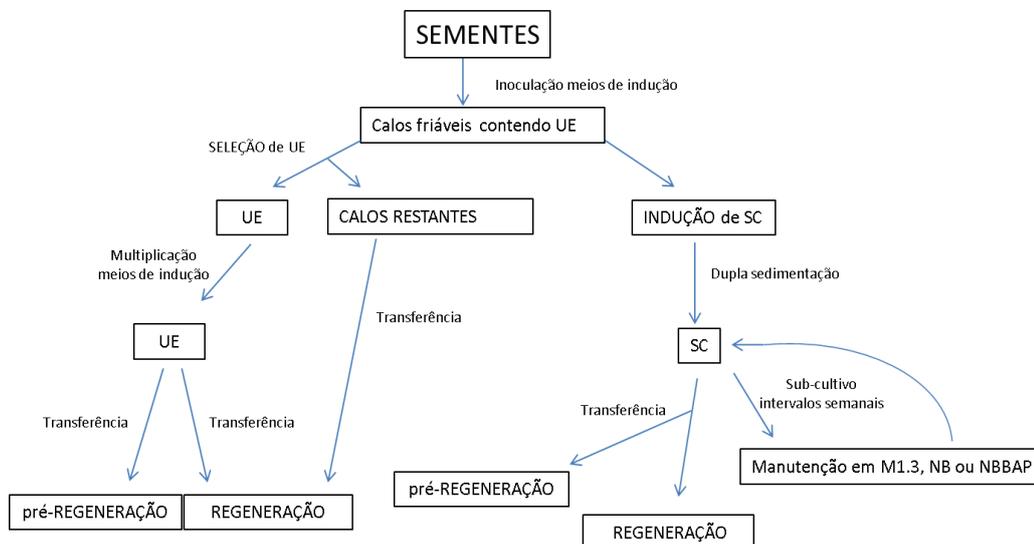
Componentes	Meios de cultura						
	M1.3	NB	DD1	MS3	MPR	NBreg	MMP
Macronutrientes	MS	N6	MS	MS	N6	N6	½MS
Micronutrientes	MS	B5	MS	MS	B5	B5	MS
Vitaminas	MS	B5	MS	MS	B5	B5	MS
ANA	--	--	--	0,5mg/L	1mg/L	0,5mg/L	0,2mg/L
2,4-D	3mg/L	2,5mg/L	1,1mg/L	--	--	--	--
BAP	0,2mg/L	--	--	1mg/L	5mg/L	3mg/L	--
Cinetina	--	--	--	2,5mg/L	--	--	0,5mg/L
ABA	--	--	--	--	2mg/L	--	--
Zeatina	--	--	0,2mg/L	--	--	--	--
GA ₃	--	--	--	--	--	--	0,2mg/L
Ácido Ascórbico	--	--	10mg/L	--	--	--	--
Inositol	--	100mg/L	--	--	100mg/L	100mg/L	--
Prolina	--	500mg/L	--	--	500mg/L	500mg/L	--
Glutamina	--	500mg/L	--	--	500mg/L	500mg/L	--
Caseína hidrol.	300mg/L	300mg/L	--	300mg/L	300mg/L	300mg/L	100mg/L
Sacarose	3%	3%	3%	3%	3%	3%	2%
Agar	1,4%	--	--	1,4%	--	--	0,7%
Phytigel	--	0,3%	--	--	--	0,6%	--
Agarose tipo I	--	--	--	--	0,7%	--	--
pH	4	5,8	5,8	4	5,8	5,8	5,8

MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962); M1.3, MS3 e MMP (CABRAL et al., 2011); DD1 (MATSUMOTO, 2006); Macro e micronutriente N6 (CHU et al., 1975); NB, MPR e NBreg (SALLAUD et al., 2003)

Indução de calos para obtenção de suspensão celular embriogênica

Calos obtidos em cada um dos meios sólidos M1.3 pH 4 ou NBBAP pH 4 ou 5,8 foram repicados para meios frescos, e após 15 dias, foram transferidos para os respectivos meios, porém sem adição de ágar. Em frascos tipo Erlenmeyer (125 mL), contendo 30 mL de meio, foram inoculados 10 a 15 calos por frasco, mantidos em agitador orbital, a 100 rpm, no escuro. Os calos foram cultivados durante três a quatro semanas para proliferação da suspensão celular

(SC), com renovação dos meios a cada sete dias. Após esse período, os calos e material diferenciado foram separados das SC por sedimentação. Numa segunda etapa de sedimentação o volume celular sedimentado (VCS) foi medido. Metade das SC continuaram sendo multiplicadas para confirmar a manutenção da capacidade embriogênica. A outra metade foi transferida para meios de pré-regeneração e regeneração, 200 a 300 mg por placa ou 1 mL VCS, para verificar a capacidade dos agregados celulares se diferenciarem em embriões e brotos. A pré-regeneração foi feita nos meios líquidos DD1 ou MPR, por uma semana, sob agitação no escuro, e então transferida para meio de regeneração. A regeneração foi feita em MS3 ou NBreg sólido, com cultivo por 3 d sob luz branda e fotoperíodo de 16 h, e depois foram transferidas para intensidade de luz de $75 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. A temperatura da sala de cultura para indução e regeneração foi sempre de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Brotos regenerados foram transferidos para tubos de ensaio para alongamento e enraizamento em meio MMP. Após um mês, as plântulas foram aclimatadas em vermiculita, e transferidas posteriormente para casa-de-vegetação.



Esquema 2.1 – Indução de calos embriogênicos em *Brachiaria brizantha* em diferentes meios de cultura (M1.3, NB ou NBBAP) para obtenção de unidades embriogênicas (UE) e suspensão celular (SC), seguida de pré-regeneração (DD1 ou MPR) e regeneração (MS3 ou NBreg) em diferentes meios.

Todos os experimentos de SC foram implantados de forma inteiramente casualizada, com pelo menos duas repetições, em cada repetição pelo menos 4 frascos de SC foram utilizadas para cada tratamento. O teste t (Student) foi utilizado para estimar diferenças significativas entre os valores médios dos tratamentos.

Análises microscópicas

Unidades embriogênicas foram coletadas em diferentes fases de desenvolvimento e foram processadas para análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de luz (ML). As amostras foram fixadas em paraformaldeído (4% v/v), desidratadas em série crescente de etanol (de 30% a 100%), em intervalos de 30 min, e transferidas para propanol por 8 h e para butanol durante a noite. A infiltração foi feita a 4 °C, utilizando butanol:meio de infiltração (Historesin, Leica) (2:1, 1:1, 1:2, mínimo de 2h cada etapa), seguida por meio de infiltração a 100% por 48 h. A polimerização foi realizada à temperatura ambiente durante 24 a 48 h, em Historesina, seguindo as instruções do fabricante. Secções histológicas seriadas (5 µm de espessura) foram obtidas, coradas com azul de toluidina em água a 0,05% (p/v), e montadas em resina sintética Entellan® (MERCK), cobertas com lamínula, analisadas em microscópio óptico Zeiss Axioskop2 HBO 100 w/2 e foto documentadas em Axioscop Zeiss 40 HBO 50 A/C (Carl Zeiss, Jena, Alemanha). Para MEV, as unidades embriogênicas foram desidratadas até etanol 100% e após a desidratação foi feita a secagem ao ponto crítico através de CO₂ líquido e montagem nos suportes metálicos, seguido da metalização em ouro, e observadas em 435 LEO VP (Carl Zeiss, Jena, Alemanha), operando a 20 keV.

4.3.Resultados e discussão

Unidades embriogênicas

Calos embriogênicos foram obtidos nos meios testados após três a quatro semanas de cultivo, como descrito no capítulo I). Observou-se formação de calos a partir das sementes em meios M1.3 e NBBAP, sendo que em meio M1.3 não houve formação de calos hídricos e foram observados calos maiores quando comparados aos obtidos em NBBAP (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 - Resposta morfológica de sementes maduras de *Brachiaria brizantha*

Meios de cultura	Número total de sementes	Número de sementes sem calos \pm DP	Número de calos com raízes e ESD $\leq 5\text{mm}\varnothing$	Número de calos com raízes e ESD $> 5\text{mm}\varnothing$	Número de calos hídricos
M1.3	400	38 \pm 5,6	81 \pm 18,4	227 \pm 20,8	0
NBBAP	352	51 \pm 4,2	165 \pm 39,6	53 \pm 11	68 \pm 14

cv Marandu em meios para indução de embriogênese somática M1.3 e NBBAP, sob pH 4

Os valores referem-se a média entre dois experimentos independentes \pm desvio padrão. ES=embriões somáticos; ESD=Embriões somáticos diferenciados com escutelo

Após a retirada das unidades embriogênicas (UE) visíveis, os calos restantes foram plaqueados em meios de regeneração. Observa-se que em meio de regeneração MS3 (Tabela 2.3), independentemente do meio de indução, houve maior obtenção de brotos, tanto diretamente como na conversão de embrião somático para brotos (Figura 2.1 A, C e D). O desenvolvimento de raízes foi menor em MS3 do que em meio NBreg, também independentemente do meio de indução (Figura 2.1 B).

A combinação de meios M1.3/MS3 foi a mais eficiente para a regeneração de brotos (100%). Isto confirma nossos resultados obtidos anteriormente quanto à elevada eficiência da combinação de meios M1.3/MS3 para indução/regeneração de plantas de *B. brizantha* via embriogênese somática (CABRAL et al., 2011). Os meios NB/NBreg para indução/regeneração, não tinham sido anteriormente testados para braquiária, e apesar de serem meios originalmente usados para embriogênese somática de arroz (SALLAUD et al., 2003), e também de serem meios mais ricos em aminoácidos livres, não superaram os resultados da combinação M1.3/MS3. A elevada formação de brotos em calos em meio MS3 pode ser favorecida por um efeito sinérgico da combinação das citocininas, cinetina (2,5 mg/L) e BAP (1 mg/L). Comportamento semelhante foi observado na formação de gemas em meio de microprogação em braquiária por Cabral et al. (2011). Na composição do meio NBreg apenas a citocinina BAP está presente a 3 mg/L. Em *Solanum surattense* a combinação de citocininas foi mais eficiente para regeneração de gemas/brotos do que

isoladamente (YADAV; KACHHWAHA; KOTHARI, 2010). A obtenção de brotos e ES em calos após a remoção das UE indica a possibilidade de embriogênese repetitiva através de regiões embriogênicas não perceptíveis nos calos obtidos a partir do escutelo, sinalizando a possibilidade de utilização desses calos sem a necessidade de separação de regiões específicas em experimentos de transformação genética.

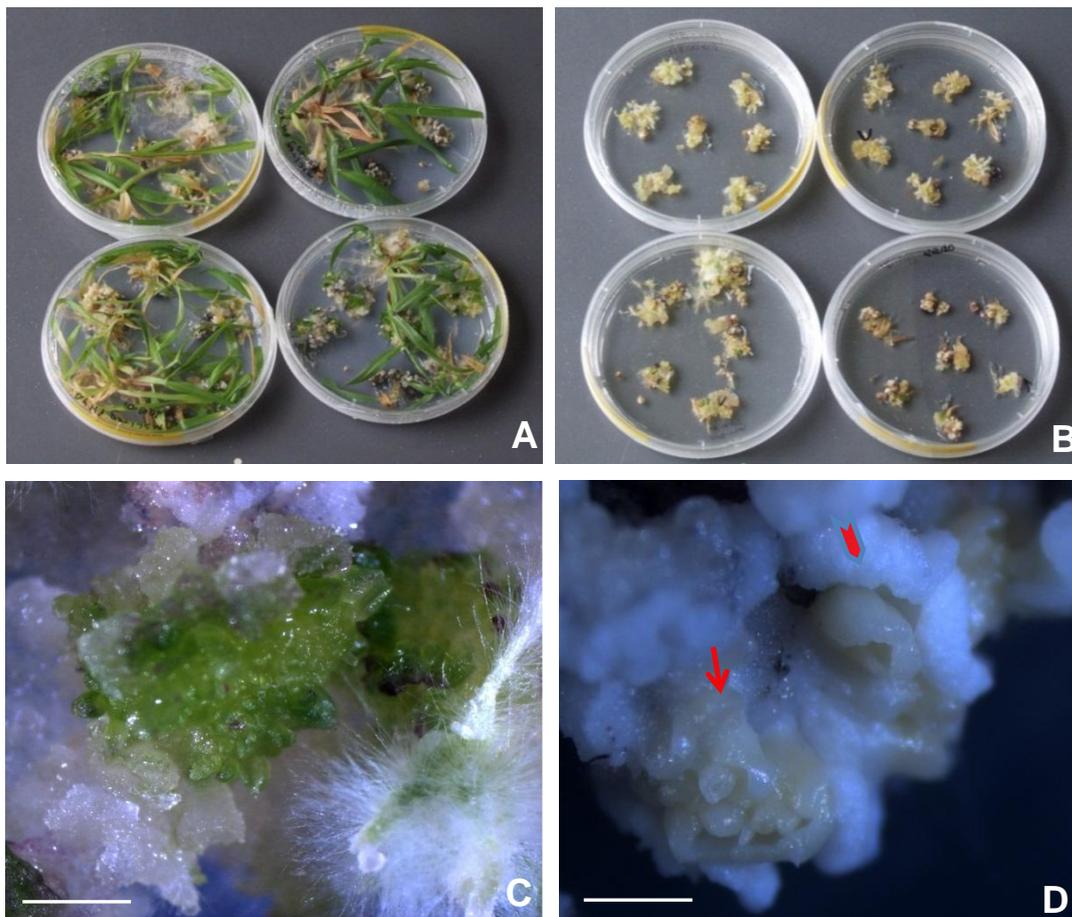


Figura 2.1 – Resposta morfogênica de calos de *Brachiaria brizantha*, sem UE visíveis, em dois meios de regeneração. (A) em meio MS3 com formação de plântulas e várias multibrotações a partir de embriões somáticos; (B) em meio NBreg com formação predominante de raízes; (C, D) calo em meio MS3 em (C) com múltiplas gemas e em (D) com grupo de embriões somáticos (seta fina) e embrião somático isolado bem diferenciado (seta) com escutelo branco neve, e eixo embrionário creme perolado. Barras: C e D = 2 mm

Tabela 2.3 – Resposta morfogênica de calos de *Brachiaria brizantha* induzidos em meios M1.3, NB e NBBAP após terem sido retiradas as unidades embriogênicas e plaqueamento em diferentes meios de regeneração (MS3 ou NBreg)

Meios de cultura		número total explantes	calos com raízes (%)	calos com raízes e ESD (%)	calos com 1 broto (%)	calos com ≤3 tufos de brotos (%)	Calos com >3 tufos de brotos (%)
NBreg	NB	243	90 (37)	90 (37)	18 (7)	30 (12)	15 (6)
	NBBAP	155	75 (48)	18 (12)	29 (19)	33 (21)	0
	M1.3	232	123 (53)	99 (43)	10 (4)	0	0
MS3	NB	72	0	21 (29)	15 (21)	0	36 (50)
	NBBAP	273	21 (5)	60 (23)	57 (20)	75 (29)	60 (23)
	M1.3	72	0	0	0	<u>36 (50)</u>	<u>36 (50)</u>

Foram usadas 300 sementes por tratamento.

No processo de diferenciação das UE de braquiária foram caracterizadas três fases distintas (Figura 2.2). Na fase I, as UE são compactas, firmes e arredondadas, com 1 a 2 mm de diâmetro (\emptyset), com superfície lisa (Figura 2.2 A e B). Em análises por MEV e ML, observou-se intensa proliferação de regiões meristemáticas, pró-embriões e embriões globulares (Figura 2.2 C, D e E). Nestas é possível observar que a superfície das UE encontra-se repleta de pequenos aglomerados celulares, ou células isoladas, que são pequenas e densamente coradas, indicando células com atividade metabólica e taxa de divisão celular elevadas (Figura 2.2 D e E), características de células competentes para embriogênese somática. Outra característica identificada através de observações microscópicas na superfície das UE é a presença de fissuras, indicando as regiões de ruptura das UE, onde essas normalmente se destacam dando origem a outras UE. Na fase II, as UE são menos compactas e mais diferenciadas (Figura 2.2 F), apresentam superfície menos lisa, medem de 3 a 4 mm \emptyset , e apresentam embriões somáticos globulares, diferenciação de eixos embrionários e escutelo (Figuras 2.2 G e 2.2 H). Na fase III, as UE apresentam pigmentação verde (clorofila) e a presença de estruturas do tipo escutelo-foliar com tricomas desenvolvidos (Figura 2.2 J). Nessa fase é frequente a observação de organogênese e embriogênese simultânea, bem como diferentes fases de desenvolvimento de embriões e gemas, característica de sistemas repetitivos (Figuras 2.2 K, 2.2 L).

As UE obtidas (Figura 2.2 A) e isoladas (Figura 2.2 B) apresentaram resposta morfogênica distinta nos três meios de multiplicação (Tabela 2.4). Em meio NBBAP, 59% das UE proliferaram calos friáveis e outras UE, indicando que este meio foi o mais adequado para manutenção do potencial embriogênico/meristemático das UE, não tendo sido relevante nos outros meios. No meio M1.3 59% das UE apresentaram embriões somáticos diferenciados (ESD), o que indica que apesar deste meio ser muito eficiente para a indução de embriogênese somática em escutelo de semente madura de *B. brizantha*, não é adequado para manter o estado meristemático e o potencial embriogênico das culturas, uma vez que rapidamente ocorre a diferenciação das UE em embriões somáticos (Figura 2.2 G), inclusive com a presença de escutelo (Figura 2.2 H). Em meio NB, as UE apresentaram maior oxidação (17%) do que nos meios M1.3 e NBBAP.

Tabela 2.4 – Efeito de diferentes meios de indução em pH 4 na multiplicação de unidades embriogênicas (UE) de *Brachiaria brizantha* em um período de 10 dias.

Meios de cultura	Número total UE	UE Oxidadas (%)	UE com calos friáveis (%)	UE com calos friáveis + UE+ ESD (%)	UE com calos friáveis + ESD (%)
M1.3	152	14 (9)	30 (20)	18 (12)	<u>90 (59)</u>
NB	268	45 (17)	104 (39)	77 (29)	42 (15)
NBBAP	306	21 (7)	52 (17)	<u>196 (64)</u>	37 (12)

UE provenientes de calos de 300 sementes. ESD = embrião somático diferenciado

Após transferência das UE para meios de regeneração, passando ou não por meio de pré-regeneração, observa-se diferenciação relativamente homogênea de embriões e raízes (Tabela 2.5). Independente do meio de indução, o meio de regeneração NBreg favoreceu a formação direta de brotos, sem diferenciação em embriões e raízes. UE induzidas em meio NB e transferidas para os meios de regeneração NB ou MS3, apresentaram as mais altas taxas de oxidação ou morte, 43 e 38%, respectivamente. Da mesma forma, as UE obtidas em meio NB em geral apresentaram altas taxas de formação de raízes, quer sejam se regeneradas diretamente em NBreg (36%), ou cultivadas em meio de pré-regeneração antes dos meios de regeneração MS3 (44%) ou NBreg (25%). Em resumo, os resultados obtidos indicam que o meio de indução

NB não favoreceu a formação de embriões e brotos, e apresentou elevada taxa de oxidação e formação de raízes, sendo, portanto, de baixa eficiência para *B. Brizantha*. O meio NBreg favoreceu a formação de brotos em UE, independentemente do meio de indução, e foi mais eficiente quando usado diretamente sem meio de pré-regeneração (Tabela 2.6). Isto possibilita redução no tempo, custos e variações somaclonais da metodologia de regeneração para transformação genética.

Desta forma, o sistema de embriogênese somática usando UE de *B. brizantha* cv. Marandu foi caracterizado, e demonstrou ser eficiente, definindo-se a fase I das UE como a mais adequada para transformação genética.

Tabela 2.5 - Resposta morfogênica a partir de unidades embriogênicas (UE) de *Brachiaria brizantha* em diferentes meios de regeneração, passando ou não por meio de pré-regeneração (MPR)

Meios de cultura		Nº total UE	UE sem regeneração (%)	UE com regeneração de raízes (%)	UE com regeneração de raízes e ESD (%)	UE regenera brotos (%)
Indução						
M1.3	MS3	128	0	20 (16)	96 (74)	12 (10)
	NBreg	140	0	24 (16)	0	116 (84)
	MPR/MS3	72	20 (27)	0	32 (43)	16 (20)
	MPR/NBreg	84	16 (19)	0	48 (67)	12 (14)
NB	MS3	204	28 (14)	12 (6)	76 (36)	12 (6)
	NBreg	56	0	20 (36)	0	12 (21)
	MPR/MS3	128	0	32 (25)	84 (66)	8 (6)
	MPR/NBreg	128	8 (6)	56 (44)	64 (50)	0
NBBA P	MS3	188	24 (14)	20 (11)	132 (70)	12 (5)
	NBreg	76	0	23 (30)	0	51 (67)
	MPR/MS3	152	36 (24)	24 (16)	68 (45)	20 (13)
	MPR/NBreg	208	44 (21)	56 (27)	60 (29)	20 (10)

Número de UE oxidadas e/ou que não apresentaram regeneração complementam os totais para 100%.

Tabela 2.6 – Sumário do processo de obtenção de unidades embriogênicas em *Brachiaria brizantha*

Etapa do processo	Melhor meio testado	período	Condições de cultura
Indução	M1.3	30 d	escuro
Multiplicação	NBBAP	10 d	escuro
Regeneração	NBreg	30 d	luz

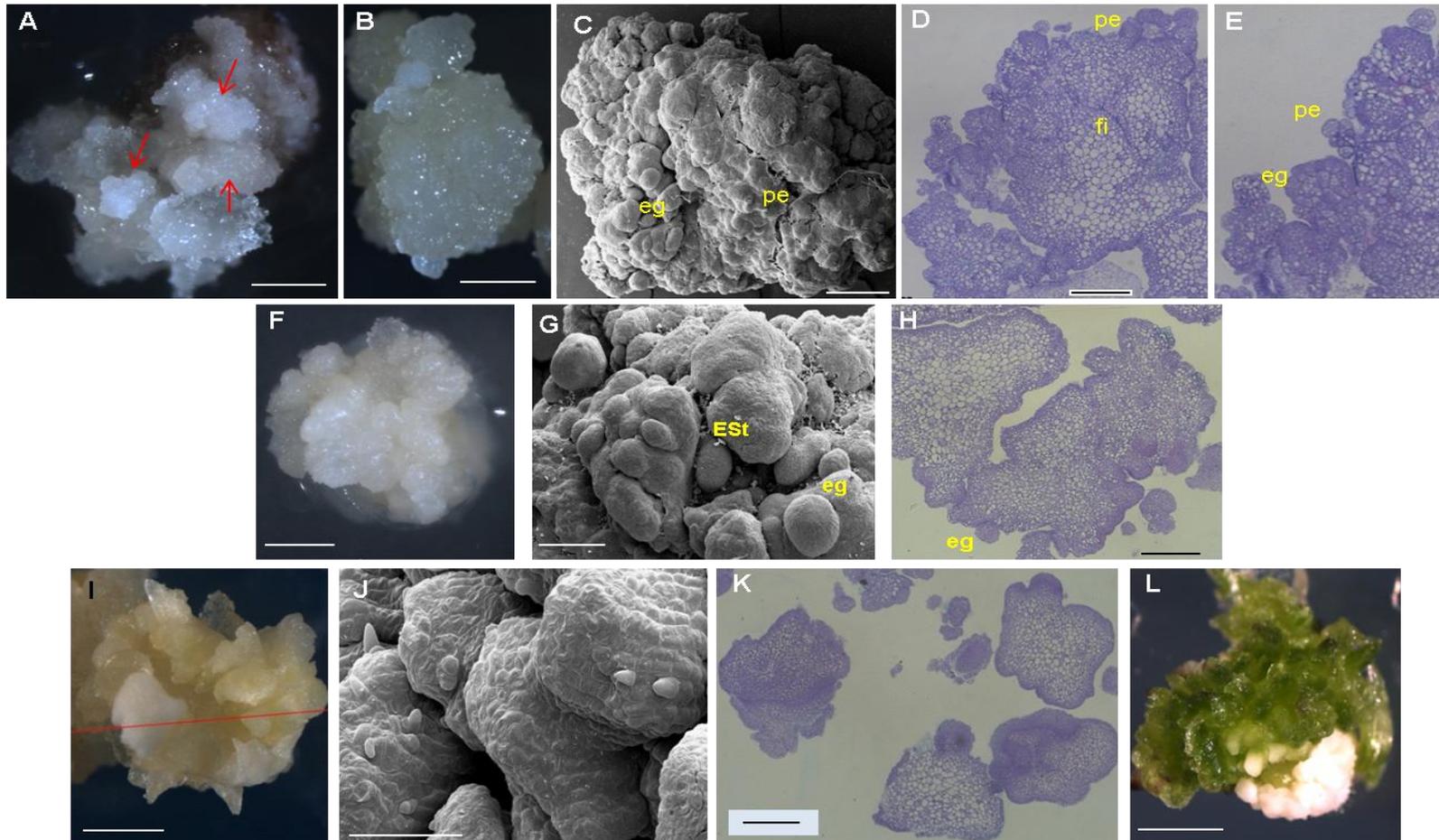


Figura 2.2 – Desenvolvimento de unidades embriogênicas (UE) de *Brachiaria brizantha* na combinação de meios M1.3/NBreg. Micrografias de luz (D, E, H, K) e micrografias eletrônicas de varredura (C, G, J). (A a E) Na fase I, UE em calos, setas (A); UE isolada de calo (B); UE com proembriões e embriões globulares (C); UE com fissura (D), proembriões e embriões globulares no detalhe (E); (F) UE na fase II com diferenciação de eixos embrionários e embrião somático no estágio de torpedo em (G) e (H); (I) UE na fase III com estruturas foliares e com várias estruturas do tipo escutelo-foliar com tricomas (J) e embrião somático apresentando escutelo bem desenvolvido e gema adventícia com proliferação de outra gema (K); (L) UE com tufo de brotos e escutelos fusionados branco neve. Barras: A, B e F = 1 mm; I e L = 2 mm; C = 500 μ m; D, G, H e K = 200 μ m; J = 100 μ m; E = 50 μ m. ES = embrião somático, col = coleóptilo; ma = meristema apical, mr = meristema radicular, ga = gema apical, eg = embrião globular, esc = escutelo, tri = tricoma, pe = proembrião, fi = fissura

Indução e regeneração de suspensões celulares

Suspensões celulares obtidas nos diferentes meios de cultura apresentaram uma fase *lag* semelhante, com duração de 4 semanas a partir da sua introdução em meio líquido (Figura 2.3 A). O efeito do pH foi analisado usando o meio NBBAP, e observou-se um aumento de quatro vezes no volume celular sedimentado (VCS) sob pH 4, em relação ao obtido sob pH 5,8 (Figura 2.4). Este aumento no VCS pode ser consequência de elevada multiplicação celular. Este resultado, juntamente com os obtidos na indução e regeneração observados em calos embriogênicos (capítulo I), indicam um efeito positivo do pH ácido na proliferação celular. Além disso, o baixo pH favoreceu a redução de contaminação das SC por bactérias endofíticas.

O volume celular medido de SC cultivadas em NBBAP e M1.3, ambos com pH 4, foi significativamente maior em M1.3 do que em NBBAP ($P < 0,05$) ao longo do tempo (Figura 2.5). Este aumento no VCS pode ser consequência da elevada proliferação celular devido ao aumento no tamanho dos grumos ou agregados celulares, uma vez que SC obtidas em meio M1.3 apresentam grumos celulares maiores do que os obtidos em meio NBBAP (Figura 2.3 B e C). Os grumos celulares obtidos em M1.3 são muito similares às UE de braquiária (descritas acima). A elevada capacidade proliferativa de SC induzidas e cultivadas em M1.3 apresenta características similares à resposta obtida tanto para calos embriogênicos (capítulo I), como para UE (Figura 2.3 D, E, F, G).

Apesar do meio NBBAP ser mais rico em aminoácidos livres (prolina e glutamina) o meio M1.3 apresenta 0,5 mg/L de 2,4D a mais, que pode ser responsável pela proliferação celular elevada. Como SC em meio M1.3 proliferaram em grandes agregados celulares, talvez este sistema seja mais adequado para a transformação genética, uma vez que a obtenção de plantas transgênicas via SC de monocotiledôneas tem sido relatada usando apenas grandes agregados celulares (OZAWA; TAKAIWA, 2010).

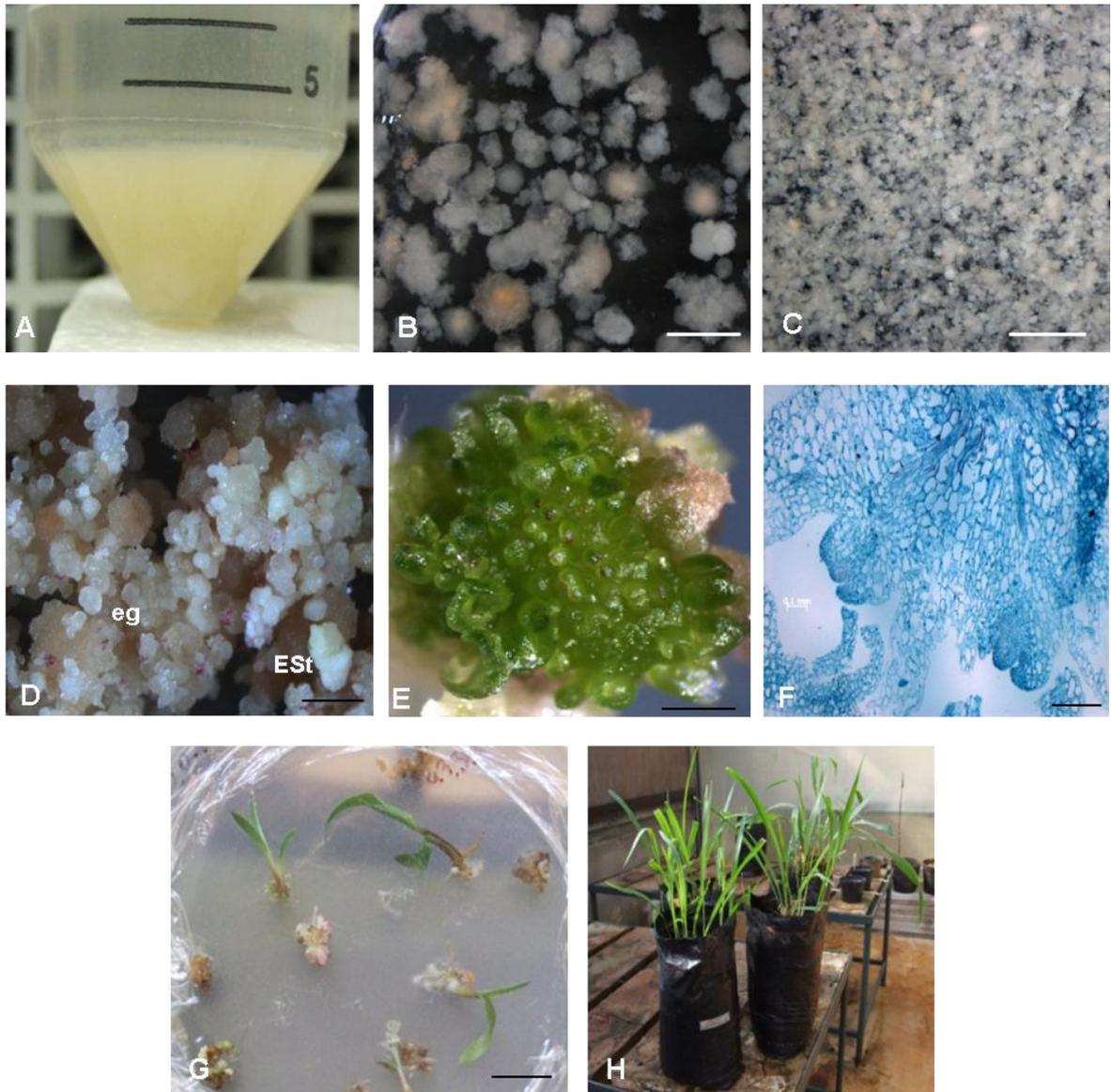


Figura 2.3 - Processo de indução e regeneração de suspensões celulares (SC) embriogênicas de *Brachiaria brizantha*. (A) Suspensão celular obtida após quatro semanas em meio M1.3 pH 4 líquido; (B, C) SC após 8 semanas em meio líquido (B) M1.3 pH 4 e (C) NBBAP pH 4; (D, E) SC em meio NBreg sólido apresentando (D) ES com ou sem diferenciação de escutelo e (E) com proliferação “de novo” de múltiplas gemas; (F) micrografia de luz de secção de aglomerado celular apresentando múltiplas gemas; (G) brotos isolados e multibrotações de SC; (H) plantas obtidas de SC em casa de vegetação. Barras: B, C, D = 2 mm, E = 1 mm, F = 200 μ m, G = 5 mm

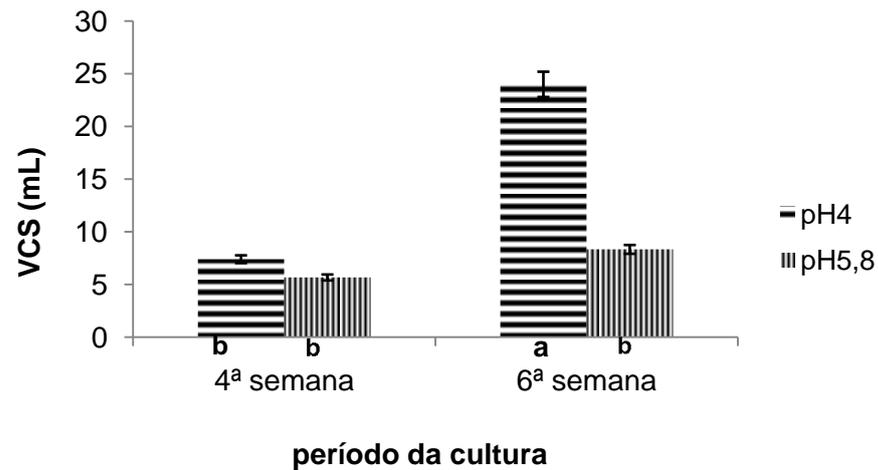


Figura 2.4 – Efeito do pH na obtenção de suspensões celulares em meio NBBAP após 4 e 6 semanas de cultura. As barras apresentam o erro padrão da média (n=6 frascos por tratamento), letras diferentes indicam tratamentos com diferença significativa pelo teste t ($P < 0,01$). VCS significa volume celular sedimentado

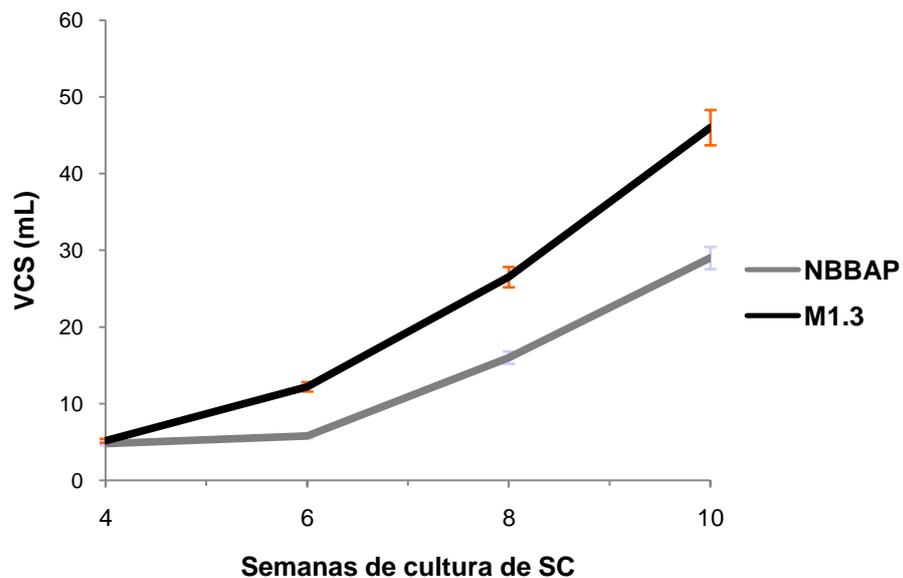


Figura 2.5 – Volume celular sedimentado (VCS) de suspensões celulares (SC) de *Brachiaria brizantha* ao longo de 10 semanas de cultura em meio M1.3 ou NBBAP em pH 4. As barras apresentam o erro padrão da média de 5 frascos. Os tratamentos apresentam diferença significativa pelo teste t ($P < 0,05$)

Uma curva de crescimento de SC foi obtida por subcultivos semanais em meio M1.3 no curso de 20 semanas, a partir da 16ª ocorreu a paralisação do aumento do volume celular, ou multiplicação das SC (Figura 2.6). Este resultado

indica que algum fator endógeno pode ter causado a estagnação ou morte das células. Dois fatores que são relatados em várias espécies durante o cultivo *in vitro* são o crescimento exacerbado de endofíticos (DONGYI; KELEMU, 2004; KELEMU et al., 2011) ou estresse oxidativo (CASSELS; CURRY, 2001; DAN, 2008).

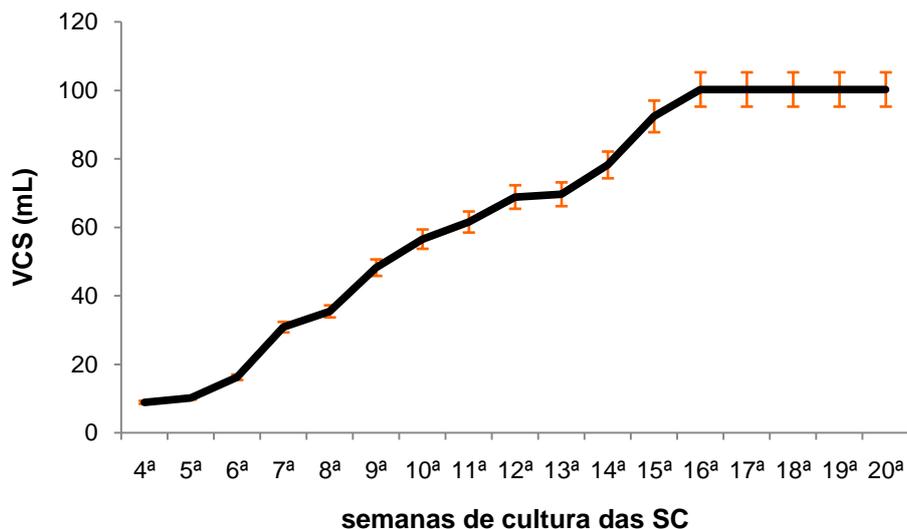


Figura 2.6 – Volume celular sedimentado (VCS) de suspensões celulares (SC) de *B. brizantha* ao longo de 20 semanas de subcultivo em meio M1.3 líquido em pH 4. As barras apresentam o erro padrão da média (n=6 frascos)

Após transferência das SC para meios de pré-regeneração ou regeneração (Esquema 2.1), observou-se a regeneração de raízes, brotos e embriões somáticos (Figura 2.3 D, E, F, G). Em alguns tratamentos observou-se elevada porcentagem de brotos albinos. O maior número de brotos verdes, bem como a maior conversão de agregados celulares para ES foi obtida a partir de SC cultivadas em meio de pré-regeneração DD1 seguido do cultivo em meio NBreg (Tabela 2.7). Entre essas duas combinações de meios, quando utilizou-se M1.3 para indução, o número de plântulas obtidas foi quase quatro vezes (328) maior do que em NBBAP (83). Além disso, em M1.3 a porcentagem de obtenção de brotos albinos foi menor (34%) quando comparada com a do meio NBBAP (69%). A evidente importância do meio DD1 pode ser devido à baixa concentração de 2,4-D (1,1mg/L), o que talvez tenha favorecido a diferenciação de agregados celulares embriogênicos em embriões somáticos, cuja germinação pode ter sido favorecida na presença de citocininas (meio de regeneração) originando plântulas isoladas, ou estimulando a proliferação

“de novo” de gemas (Figura 2.3 E, F). O meio NB é um meio de cultivo descrito para arroz e foi testado para braquiária por ser um meio mais rico em aminoácidos livres, ou casaminoácidos como prolina e glutamina, no entanto, o meio original sem a presença de BAP não produziu bons resultados. Já o meio NB com adição de BAP (0,2 mg/L) quando usado para indução, apresentou boa regeneração de brotos verdes, de uma maneira geral, independentemente do meio de pré-regeneração ou regeneração usado. O papel da citocinina BAP no meio de indução foi discutido no capítulo I. A proliferação de células indiferenciadas nas diferentes combinações de meios mostrou-se mais elevada em SC induzidas em meio NBBAP do que nas SC obtidas em M1.3.

Tabela 2.7 – Regeneração de suspensões celulares de *Brachiaria brizantha* cultivadas em diferentes meios de cultura

Meios de cultura testados		Resposta Morfogênica			
Indução	Regeneração	número raízes/cm ²	número ES/cm ²	proliferação calos	regeneração brotos
NB	NBreg	13±5,8	8,5±2,5	+++	-
	MS3	2±0,5	5,4±3,2	+++	2v
M1.3	NBreg	0,4±1,2	8,3±1,3	++	1v
	MS3	5,8±3,1	2,3±1,4	+	-
NBBAP	NBreg	5,1±3,9	9,6±3,1 ⁺	+++	4v
	MS3	2,7±1,4	9,7±2,9	+++	46v
NBBAP/MS3lí	NBreg	-	10±3,5	+++	20v
	MS3	-	9,5±2,4 ⁺	+	63v
M1.3/MS3líq	NBreg	-	7,9±2,8 ⁺	+++	-
	MS3	-	4,1±2,7 ⁺	+	-
NBBAP/DD1	NBreg	-	11±2,7	+++	<u>83v + 57a (69%)</u>
M1.3/DD1	NBreg/MS3líq	11±5,4	10±3,2 ⁺	+	<u>328v + 112a (34%)</u>

*média de 6 placas/tratamento. ⁺= presença abundante de antocianina. v = brotos verdes; a = brotos albinos

A combinação dos meios M1.3/DD1/NBreg/MS3líq foi a mais eficiente para a obtenção, multiplicação e regeneração de SC e as etapas deste processo estão ilustradas na Figura 2.3 (A a G). A partir do sistema de SC foram obtidos brotos isolados e multibrotações, assim como em calos e UE. Plântulas obtidas de

SC não apresentaram alterações fenotípicas em casa de vegetação e produziram sementes (Figura 2.3 H).

Gordon et al.(2007) demonstraram em *Arabidopsis thaliana* que o 2,4-D é suficiente para induzir a formação de calos com proliferação de células pluripotentes, e que isso ocorre devido à incapacidade do tecido do explante de regular o efluxo de auxina, levando a uma proliferação descontrolada dessas células. Como consequência da transferência dos calos induzidos para meio com citocinina, ocorre então, a proliferação de meristemas apicais, ou gemas adventícias, em áreas de proliferação celular onde foram detectadas baixas concentrações de auxina e altas de citocinina. Estes resultados os levaram a propor um modelo onde gradientes de auxina e citocininas especificam a identidade celular no calo. Neste modelo o destino da célula dentro de um calo em meio de regeneração é definido pela distribuição não-homogênea de auxina e citocinina. A diferença principal entre a iniciação de meristema apical na planta e a indução de meristemas “de novo” na cultura, seria a distribuição inicial de auxina e citocinina. A distribuição de auxina e citocinina é rigorosamente controlada em todas as fases durante o desenvolvimento vegetal, enquanto que esta distribuição deve ser gradualmente reorganizada a partir de condições iniciais durante a indução de brotações em cultura. A proliferação de gemas adventícias em explantes submetidos a embriogênese somática usando 2,4-D em *B. brizantha* possivelmente ocorra pela distribuição heterogênea de auxina/citocinina nos calos induzidos, como ocorre em *Arabidopsis*.

Em *B. brizantha*, assim como em *Pogonatherum paniceum* (Poaceae) (WANG et al., 2008), embriogênese somática e/ou organogênese ocorrem simultaneamente em um mesmo calo ou em calos diferentes obtidos de cariopses maduras. Em ambas as espécies, a embriogênese somática indireta e/ou organogênese direta e indireta foram controladas por dois tipos de reguladores de crescimento vegetal(WANG et al., 2008), o mesmo sendo relatado em *Pennisetum*(TALWAR; RASHID, 1990) e cenoura (RIBNICKY et al., 1996). A plasticidade de desenvolvimento é variável em diferentes espécies, não se conhecendo completamente a habilidade de reprogramação em casos específicos.

Usando nosso sistema de SC de *B. brizantha* foi possível identificar a expressão do gene *SERK*, por hibridização *in situ*, nas células superficiais dos aglomerados celulares, confirmando a identidade embriogênica das mesmas

(KOEHLER, 2010). Estes resultados demonstram o potencial do uso das SC embriogênicas para transformação genética e o uso do gene *SERK* como marcador embriogênico em *Brachiaria*.

4.4 CONCLUSÕES

- ✓ Calos embriogênicos podem ser usados como explantes para transformação genética de *B. brizantha*.
- ✓ Foi obtido um sistema de embriogênese somática a partir de unidades embriogênicas (UE) de *B. brizantha*, usando os meios M1.3 de indução, NBBAP para multiplicação das UE, e meio NBreg para regeneração.
- ✓ Foi estabelecida uma metodologia para obtenção, multiplicação e regeneração de suspensão celular de *B. brizantha* usando a combinação de meios M1.3, DD1, NBreg, MS3líq.
- ✓ As SC obtidas em meio M1.3 são compostas de grandes agregados celulares, podendo ser mais adequados para transformação genética de braquiária.

Capítulo III: Transformação genética de *Brachiaria brizantha* via biobalística

Resumo

Brachiaria brizantha cv. Marandu, é uma forrageira tropical cultivada em milhões de hectares no Brasil por ser resistente a cigarrinha das pastagens. Esta espécie, por ser apomítica e por causa da diferença de ploidia entre a planta apomítica, que é tetraplóide, e o acesso sexual que é diplóide, dificultando o melhoramento através de cruzamentos. A transformação genética é uma opção para introdução de características agrônômicas desejáveis nessa planta. A transformação direta via biobalística vem sendo utilizada para estudos de expressão transiente de genes e para a obtenção de plantas transgênicas de várias espécies de monocotiledôneas que não são suscetíveis a *Agrobacterium*. Culturas embriogênicas ou embriões imaturos continuam sendo os alvos mais utilizados para a transformação genética de monocotiledôneas. O objetivo deste trabalho foi obter sistemas de transformação genética transiente e estável para *B. brizantha*. Uma curva de sobrevivência a higromicina, agente de seleção escolhido, e a construção de dois plasmídeos binários contendo genes marcadores foram obtidas. Sementes intactas e embrião isolado de sementes maduras foram introduzidos em meios para indução de embriogênese somática por diferentes períodos, tendo sido bombardeados com o gene *gus* em diferentes condições. Calos embriogênicos e suspensão celular embriogênica obtidos em dois meios também foram bombardeados com os genes *gus* e *hptII* utilizando-se vários agentes osmóticos e diferentes pressões de gás Hélio. Após o bombardeamento os explantes foram submetidos a distintas pressões de seleção e condições de cultivo. A expressão do gene *gus* foi visualizada por teste histoquímico, e os calos e plântulas resistentes ao antibiótico higromicina foram analisados por PCR e *Southern blot*.

Palavras-chave: expressão gênica. genes marcadores. escapes. *gus*. *hptII*. calos resistentes a higromicina. Poaceae. apomixia.

Abstract

Brachiaria brizantha cv. Marandu is a tropical forage grass largely grown in Brazil, and is very important to be tolerant to spittlebugs. This species presents difficulties for conventional breeding due to apomixis and ploidy differences between tetraploid apomictic and diploid sexual accessions. Genetic transformation is an alternative to introduce desirable agronomic traits in this species. Direct transformation via biolistics has been used for transient gene expression studies and for producing transgenic plants from monocot species that are not susceptible to *Agrobacterium*. Embryogenic cultures or immature embryos are mainly the targets for genetic transformation of monocots. The main goal of this study was to obtain an efficient transient and stable genetic transformation system for *B. brizantha* through biolistics. Two binary plasmids containing marker genes were constructed for transformation of tissue and callus. Explants were isolated from seeds (seed embryo) and intact mature seeds, which were cultivated in somatic embryo induction medium in different periods, and bombarded under different conditions. Embryogenic callus and embryogenic cell suspensions were bombarded with the vectors containing the *gus* and *hptII* genes with various bombardment settings (helium pressure). They were subjected to different selection pressures and growing conditions after bombardment. The *gus* gene expression was visualized by *GUS* histochemical assay and hygromycin resistant calli and plantlets were analyzed by PCR and *Southern* blot.

Keywords: gene expression. marker genes. escapes. *gus*. *hptII*. hygromycin resistant callus. Poaceae. apomixis.

5.1 Introdução

Espécies de *Brachiaria* são amplamente cultivadas no Brasil, sendo importantes forrageiras tropicais, especialmente *B. brizantha* cv. Marandu e *B. decumbens* cv. Basilisk. *B. brizantha* cv. Marandu, além de ocupar milhões de hectares no Brasil, é muito importante por ser tolerante a cigarrinha das pastagens (FELISMINO et al., 2012). Estas espécies são difíceis de serem melhoradas através de cruzamentos, por apresentarem reprodução assexuada ou apomixia. Apesar da apomixia ser facultativa, *B. brizantha* reproduz-se quase que exclusivamente por aposporia (VALLE; SAVIDAN, 1996; DUSI, 1999; ALVES; CARNEIRO; ARAÚJO, 2001), havendo a produção de sementes sem fecundação da oosfera (ASKER; JERLING, 1992). Como consequência, os embriões das sementes são efetivamente propágulos da planta-mãe. Além da apomixia, ocorre a diferença de ploidia entre as plantas apomíticas, que são normalmente poliplóides, e os acessos sexuais diplóides, inviabilizando os cruzamentos (VALLE; SAVIDAN, 1996).

A transformação genética é uma opção para introdução direta de características agronômicas ou ecológicas desejáveis nessas plantas (DALTON et al., 2003). Além disso, a transformação genética de *B. brizantha* permitirá análises funcionais de genes candidatos relacionados a apomixia (RODRIGUES et al., 2003; SILVEIRA et al., 2011) por superexpressão e silenciamento (LI et al., 2010).

A transformação por biobalística tem viabilizado a produção de plantas transgênicas de muitas espécies recalcitrantes (SHARMA et al., 2005) de monocotiledôneas não suscetíveis a *Agrobacterium* (SOOD; BHATTACHARYA; SOOD, 2011). Culturas embriogênicas ou embriões imaturos continuam sendo os alvos mais utilizados para a transformação de cereais e gramíneas forrageiras (HARWOOD, 2012).

Em *B. ruziziensis* a obtenção de plântulas expressando genes marcadores foi descrita (LENIS-MANZANO, 1998), entretanto nas plantas aclimatadas em casa de vegetação a expressão não pode ser confirmada nem a inserção do gene foi observada (dados não publicados). Recentemente, Ishigaki et al. (2012) bombardearam calos embriogênicos e múltiplos brotos de *Brachiaria ruziziensis* diplóide com um vetor contendo os genes marcadores de resistência ao herbicida fosfinotricina (*bar*) e repórter *gus*, ambos sob controle do pUbi1Zm. Calos

embriogênicos apresentaram um número significativamente maior de expressão transiente da GUS por placa, sugerindo que calo embriogênico é o explante alvo mais adequado. Obtiveram quatro calos resistentes a bialaphos 10 mg/L, quando calos embriogênicos foram induzidos em meio MS suplementado com 2,4-D 4 mg/L e BAP 0,2 mg/L. Desses, dois produziram brotos, dos quais duas plantas expressando estavelmente o gene *gus* foram obtidas. As duas linhagens apresentaram duas ou cinco cópias do gene *gus*, confirmando que foram eventos diferentes de transformação. As plantas transgênicas tiveram fenótipo normal e floresceram, no entanto, não produziram sementes. Plantas férteis foram obtidas de calos que haviam sido duplicados por colchicina. Para *B. brizantha*, até o momento, não existe relato na literatura de transformação genética.

Neste trabalho foram utilizados os plasmídeos pAHC27 (CHRISTENSEN; QUAIL, 1996) contendo o gene *gus* dirigido pelo promotor de ubiquitina 1 de milho pUbi1 (pUbi1Zm), e dois vetores binários, o pGPro1 e o pGPro2 (THILMONY et al., 2006, 2009). Embora ambos possuam características que os tornam eficientes para a transformação mediada por *Agrobacterium*, eles também podem ser utilizados para bombardeamento. Apresentam um *polylinker* para clonagem do promotor a ser testado para dirigir a expressão do gene repórter fusionado *gus/egfp* que codifica para ambas as proteínas GUS, β -glucuronidase, e eGFP, *enhanced green fluorescent protein*. O gene marcador de seleção *hptII*, higromicina fosfotransferase, é dirigido pelo promotor do gene de actina1 de arroz, pAct1Os, que é um gene constitutivo bastante utilizado para monocotiledôneas (THILMONY et al., 2006). No pGPro1 o pAct1 é do tipo selvagem, enquanto no pGPro2 o pAct1 apresenta duas mutações que intensificam a sua transcrição (comunicação pessoal Dr. Thilmony).

O objetivo deste trabalho foi obter plantas transgênicas de *B. brizantha*, assim como um sistema eficiente de expressão transiente de genes. Com este intuito, vários explantes como semente intacta, embrião isolado de semente madura, calos embriogênicos e suspensão celular embriogênica foram bombardeados com os genes marcadores *gus* e *hptII*.

5.2 Material e Métodos

Plasmídeos

Os plasmídeos utilizados neste trabalho estão descritos na Figura 3.1

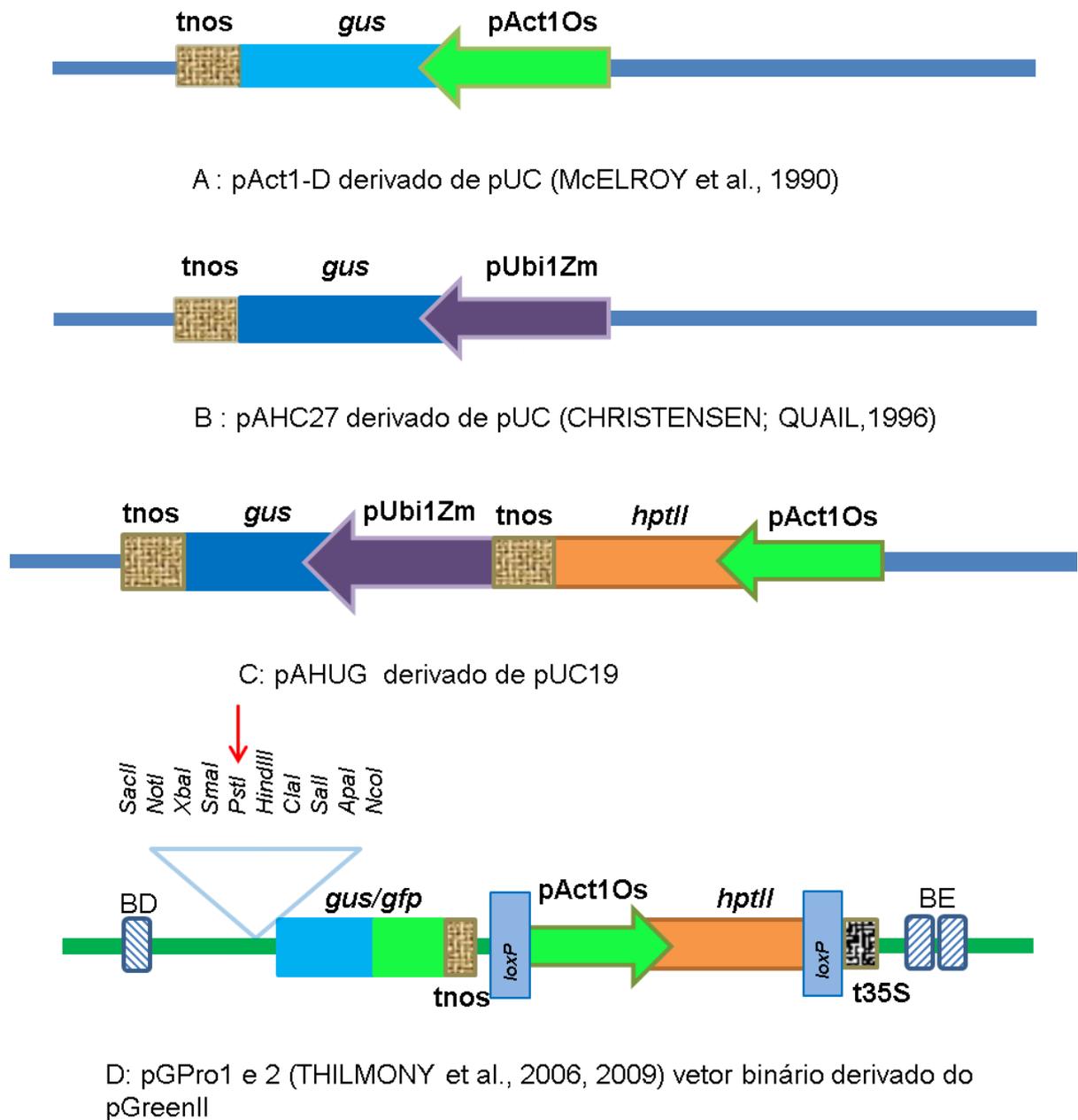


Figura 3.1 – Representação esquemática dos plasmídeos usados para transformação genética de *Brachyaria brizantha* via biobalística. (seta) Indica sítio de *PstI* onde foi feita a clonagem do pUbi1Zm

Clonagem do promotor pUbi1Zm nos vetores binários pGPro1 e 2

O plasmídeo pAHC 27 (CHRISTENSEN; QUAIL, 1996) foi digerido com a *Pst*I para liberar integralmente o promotor pUbi1Zm. Os plasmídeos pGPro1 e pGPro2 (THILMONY et al., 2006, 2009), números de acesso ao banco de dados DQ452049 para pGPro1 e EU147786 para pGPro2, possuem um sítio múltiplo de clonagem, com vários sítios únicos de reconhecimento de enzimas de restrição, para clonagem de promotores a serem testados quanto à expressão dos dois genes repórteres fusionados *gusA/egfp* (Figura 3.1).

Preparação do inserto

O promotor pUbi1Zm foi retirado do plasmídeo pAHC27 por digestão com a enzima de restrição *Pst*I. O sistema de digestão continha: pAHC27 20 µL, *Pst*I (10U/µL da Invitrogen) 1 µL, Tampão React 2 10X (Invitrogen) 10 µL e água ultrapura autoclavada q.s.p. 100 µL. Após incubação por 2h a 37°C o sistema de digestão foi submetido a eletroforese em gel de agarose 0,8%. O fragmento correspondente ao pUbi1 foi recortado do gel e purificado usando o kit da Promega Wizard SV gel and PCR Clean-up System™. A concentração do fragmento foi determinada em espectrofotômetro Nano-Drop ND-1000.

Preparação do vetor

Os plasmídeos pGPro1 e pGPro2 foram digeridos (10 µL) com a enzima de restrição *Pst*I (10 U/µL Invitrogen) 1 µL, tampão React 2 (Invitrogen) 5 µL e H₂O q.s.p. 50 µL. Após incubação por 2 h a 37°C o sistema de digestão foi submetido a eletroforese em gel de agarose 0,8%. Os fragmentos correspondentes aos vetores foram recortados do gel e purificados usando o kit da Promega Wizard SV gel and PCR Clean-up System™, seguindo orientações do fabricante. Cada vetor foi desfosforilado num sistema contendo: DNA (pGPro1 ou pGPro2) 10 µL, enzima fosfatase Fast AP (1U/µL Fermentas) 1µL, tampão Fast AP 10X 2 µL e H₂O *nuclease free* q.s.p. 20 µL, incubados a 37°C por 30 min e depois durante 5 min a 75°C para inativação da enzima. As concentrações dos vetores foram determinadas em espectrofotômetro Nanodrop. A relação inserto:vetor utilizada na reação de ligação foi de 3:1 e consistiu de pUbi1/*Pst*I 6 µL, pGPro1/*Pst*I/DeP 10 µL ou pGPro2/*Pst*I/DeP 7 µL, T4-ligase (1U/µL - Invitrogen) 1 µL, tampão da T4-ligase 5X 4 µL e água q.s.p 21 µL. A reação foi incubada a 22°C durante a noite. Após diálise

por 4 h em tampão tris 10mM pH 8,0, os sistemas de ligação foram desidratados em evaporador centrífugo tipo *Speed-Vac*® por 2h e ressuspensos em 10 µL de água ultrapura autoclavada. Em seguida, 2µl de cada sistema foram submetidos a eletroporação em 40 µL de células competentes de *Escherichia coli* XL1BLUE (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Após serem crescidas, as células foram plaqueadas em meio LB sólido contendo canamicina 100 mg/L. As placas foram incubadas a 37°C durante a noite. Dez colônias de cada plasmídeo foram selecionadas, crescidas em 5mL de meio LB contendo antibiótico, e foi feita minipreparação de DNA por lise alcalina (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

Análise das sequências

As sequências foram sequenciadas e analisadas usando o programa BioEdit para análise da qualidade do sequenciamento e resgate das sequências no formato FASTA. Depois foi utilizado o método de BLASTN - *Basic Local Alignment Search Tool* – para buscar a identidade da sequência obtida contra os bancos de dados de nucleotídeos públicos disponíveis no sítio do NCBI: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome. Foi utilizado o programa DNAMAN para alinhamento das sequências dos clones obtidos com a sequência do inserto alvo (pUbi1Zm) para confirmação dos mesmos, assim como, a análise das enzimas de restrição dos insertos para avaliação da orientação correta do inserto.

Maxipreparação de plasmídeos para biobalística (Lise Alcalina)

Os plasmídeos foram preparados para bombardeamento usando o protocolo de lise alcalina descrito por Sambrook et al. (1989), foram quantificados em espectrofotômetro (Nanodrop) e suas concentrações ajustadas para 1 µg/µL.

Curva de sobrevivência à higromicina

Calos induzidos em meio M1.3 por três semanas foram transferidos para o mesmo meio contendo higromicina em diferentes concentrações 0; 2,5; 5; 10; 15; 20; 30 e 50 mg/L. Após duas semanas de cultivo no escuro a 25 ± 2 °C, os calos foram transferidos para meio de regeneração MS3 contendo higromicina nas

mesmas concentrações. Após um mês de cultura em condições de luz, os calos foram avaliados quanto à sobrevivência, proliferação e morfogênese de brotos.

Cultura de tecidos

Para identificar o explante mais adequado para transformação genética de *B. brizantha* via biobalística foram avaliados quatro tipos de explantes: 1. embriões isolados de sementes maduras; 2. sementes maduras inteiras; 3. calos embriogênicos; 4. suspensão celular.

Para introdução dos explantes *in vitro*, os meios de cultura utilizados estão apresentados nas Tabelas 2.1 (capítulo II) e 3.1.

Tabela 3.1 - Meios de cultura utilizados para indução de calos embriogênicos e enraizamento que não foram descritos no capítulo II (Tabela 2.1)

Composição	M1.2	B
Macronutrientes	MS	MS
Micronutrientes	MS	MS
Vitaminas	MS	B5
2,4-D	4mg/L	-
Caseína hidrol.	100mg/L	-
Sacarose	3%	3%
Agar	0,7%	0,7%
pH	5,8	5,8

Embriões isolados de sementes maduras vs. sementes maduras

Sementes desinfestadas foram plaqueadas diretamente nos meios de indução, ou os embriões foram excisados das sementes utilizando microestereoscópio Zeiss-Stemi SV11 em capela de fluxo laminar. Posteriormente foram posicionados em placa de Petri contendo meio de indução de embriogênese somática M1.2 (Tabela 3.1).

Efeito do período de indução de ES em sementes e embriões isolados

Sementes inteiras ou embriões excisados foram submetidos a períodos de cultura de um, três, cinco ou sete dias em meio de indução de embriogênese somática M1.2 (Tabela 3.1). Após o período de indução, os explantes foram bombardeados com o plasmídeo pAct1-D (McELROY et al., 1990) (Figura 3.1) em

meio M1.2 com Phytigel[®] 0,7% (meio de bombardeamento); tendo sido analisados por teste histoquímico 75 explantes por tratamento, 24 ou 48 horas após o bombardeamento.

Para avaliar a estabilidade do gene *gus*, 650 embriões foram bombardeados, e 40 embriões foram avaliados histoquimicamente 24 h após o bombardeamento (20 embriões de cada meio). Os demais explantes foram mantidos no escuro em meio de indução de embriogênese somática e após 10 e 20 dias foram avaliados por teste histoquímico, com duas repetições para cada experimento.

Calos embriogênicos

Calos obtidos de sementes maduras intactas foram cultivados em meio M1.3 (Tabela 2.1) por 7, 15 ou 30 d, tendo sido posicionados em placas de Petri de 6 cm de diâmetro contendo meio de bombardeamento - M1.3 com 0,7% de Phytigel, perfazendo um perímetro distante do centro da placa num raio de 1 cm (zona de morte dos explantes). Os calos permaneceram no meio de bombardeamento 1, 2, 3 ou 4 d antes de serem bombardeados.

Após o bombardeamento, os calos foram mantidos por 24 ou 48 h a 25 ± 2 °C no escuro. Após este período, metade dos explantes de cada placa foi coletada e submetida a ensaio histoquímico, enquanto a outra metade foi transferida para meio de indução (M1.3) ou regeneração (MS3), contendo higromicina nas concentrações de 5, 10, 15, 20 ou 30 mg/L. Foram mantidos a 25 ± 2 °C por 20 d, no escuro, quando foram transferidos para o meio de indução, ou sob fotoperíodo de 12 h quando transferidos para o meio de regeneração. Em seguida, os calos embriogênicos foram cultivados em meio de regeneração com 10 mg/L de higromicina, por 30 d. Brotos resistentes a higromicina foram transferidos para meio de manutenção de plantas (MMP) com 20 mg/L de higromicina e por último, transferidos para meio B para enraizamento, com 20 mg/L de higromicina por 30 d (Tabela 3.1). As plântulas resistentes ao processo de seleção foram aclimatadas em casa de vegetação em uma mistura de 1/1 de terra e vermiculita, tendo sido retirados pedaços de folhas para extração de DNA e realização de PCR.

Suspensões celulares

Suspensões celulares (SC) induzidas em meio M1.3 ou NBBAP pH 4 foram coletadas com uma pipeta Gilson (P5000) com ponteira cortada, e depositadas em papel filtro autoclavado para retirada do excesso de meio líquido. Foram coletados 200 a 300 mg de agregados celulares que foram espalhados com auxílio de uma espátula, em meio de bombardeamento (M1.3 com 0,7% phytigel), evitando o centro da placa de 6 cm, onde permaneceram por 4 ou 24 h antes do bombardeamento. Ao meio de bombardeamento foi adicionado em tratamentos diferentes, sorbitol 0,25 M e/ou manitol 0,25 M, ou ainda sacarose 12%. Após o bombardeamento, as células foram incubadas no escuro por 24 ou 48 h. Parte das células foi coletada para a análise da expressão da GUS pelo método histoquímico. A outra parte das células foi transferida para os meios de cultura, M1.3 ou NBBAP líquido ou M1.3 sólido, afim de favorecer a divisão das células transformadas na presença ou não do antibiótico higromicina (5 ou 10 mg/L). As SC cultivadas em meios líquidos, foram transferidas para os meios de pré-regeneração líquidos, DD1 ou MPR, por uma semana sob agitação orbital de 100 rpm no escuro, e então transferidas para meios de regeneração MS3 líquido ou sólido, com cultivo por 3 d sob luz branda e fotoperíodo de 16 h, e depois foram transferidas para intensidade de luz de $75 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. A temperatura da sala de cultura para indução e regeneração foi sempre de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. As concentrações de higromicina nos meios de pré e regeneração foram de 10, 20 ou 30 mg/L. As células transferidas para meio M1.3 sólido com ou sem agente de seleção foram cultivadas por 20 d no escuro e transferidas para MS3 ou NBreg sem ou com 20 mg/L de higromicina por 15 dias.

Brotos regenerados foram transferidos para frascos do tipo *magenta box* contendo o meio MMP sem higromicina por 20 d, e transferidos para tubos de ensaio para enraizamento. Após um mês, as plântulas foram aclimatadas em vermiculita, e transferidas para solo em casa de vegetação.

Biobalística

A precipitação do DNA plasmidial nas partículas foi feita segundo Aragão et al. (1996, 2002). As condições físicas do bombardeamento utilizando um acelerador a alta pressão de gás Hélio (ARAGÃO et al., 1996), foram: pressão de gás Hélio 900 ou 1.200 psi, distância do anteparo para os explantes de 6 cm e vácuo de 27 lb de Hg, tendo sido dado um ou dois tiros por placa. Os controles consistiram de:

controle de transformação genética (TG) no qual o DNA foi substituído por água na precipitação com as partículas, e os explantes submetidos ao bombardeamento e à pressão de seleção. Controle de regeneração (RG) no qual os explantes não foram submetidos ao bombardeamento e foram cultivados a posteriori sem a presença do antibiótico.

Detecção histoquímica do gene gus

Todos os explantes bombardeados foram analisados histoquimicamente após serem submetidos a vácuo por 5 min, e então colocados por 16 h a 37°C no escuro (JEFFERSON, 1987). O resultado foi observado em microestereoscópio Zeiss Stemi SV11.

Extração de DNA dos calos e plantas resistentes à higromicina

Foi utilizado um método rápido de extração de DNA que consiste em macerar um pedaço de folha jovem (1,0 a 2,0 cm), calo ou SC com bastão de vidro dentro de um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL contendo tampão Tris HCl pH 8 0,1 M, NaCl 0,25 M, EDTA 25 mM e SDS 0,5% à TA. Após a maceração, o material foi centrifugado por 5 min a 12.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde foi adicionado 1 volume de isopropanol (1:1, v/v) e incubado por 5 min à temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada por 5 min a 12.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 20 µL de água ultrapura autoclavada.

PCR (Polimerase Chain Reaction)

Para a reação de PCR foram usados iniciadores para o gene *gus* que amplificam um fragmento de 420 pb (*forward*TTGGGCAGGCCAGCGTATCGT e *reverse*ATCACGCAGTTCAACGCTGAC), e para verificar a presença do gene *hptII* foram usados iniciadores que amplificam um fragmento de 473 pb (*forward* TCCGCAAGTGCTTGACATTGG e *reverse* ATGTTGGCGACCTCGTATTGG). Para as reações de PCR foram utilizados 40 ng de DNA genômico das plantas resistentes, 2 U de enzima taq Polimerase (Pht), 1 µM de primers, 1,5 mM de MgCl₂, 0,25 mM de dNTPs, 1x de tampão de PCR (Pht) e H₂O ultrapura autoclavada para um volume final de 25 µl. O controle negativo da reação consistiu de uma amostra contendo água substituindo o DNA, e o controle positivo continha o DNA do

plasmídeo pAHUG ou pGPro1pUbi1. O programa de amplificação foi o mesmo para as dois genes: desnaturação a 95°C por 5 min, 35 ciclos de 95°C por 1 min, 60°C por 1 min, 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% corado com BrEt sob luz ultravioleta no Eagle eye.

Análise dos calos e plantas resistentes por “Southern Blot” do gel da PCR

Os produtos da PCR contidos no gel de agarose foram transferidos por capilaridade para uma membrana de nylon (Hybond-N⁺ Amersham Pharmacia Biotech) (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). A membrana contendo os fragmentos amplificados por PCR foi hibridizada com uma sonda do fragmento de 420 pb correspondente ao gene *gus* ou com a sonda de 473 pb relativa ao gene *hptII*. As sondas foram marcadas radioativamente com [α^{32} P] dCTP conforme instruções do fabricante do kit Ready-to-go (Pharmacia Biotech).

5.3 Resultados e Discussão

Clonagem do promotor pUbi1Zm nos vetores binários pGPro1 e 2

Obtenção do inserto: a digestão do plasmídeo pAHC27 com a enzima *Pst*I resultou em dois fragmentos, uma banda de 2 kb equivalente ao pUbi1Zm e uma banda de 4,8 kb correspondente ao plasmídeo (Figura 3.2).

Obtenção dos vetores: digestão dos plasmídeos pGPro1 e pGPro2 com a enzima *Pst*I, mostrando sua linearização, uma vez que esta enzima tem sítio único.

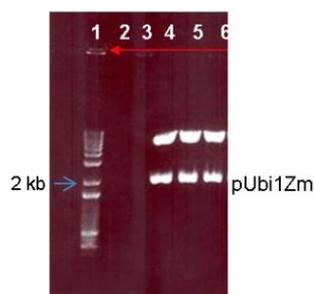


Figura 3.2 – Gel de agarose 0,8% mostrando digestão do plasmídeo pAHC27 com a enzima *Pst*I. Linha 1 corresponde ao marcador de peso molecular 1 Kb DNA ladder e de 4 a 6 a digestão do pAHC27 com fragmento de 2 Kb que correspondente ao promotor pUbi1Zm

Três dos 20 clones digeridos com a enzima *SaI* liberaram fragmentos. O clone 1.1 do pGPro1 liberou uma banda de $\pm 1,4$ Kb, enquanto os clones 2.6 e 19 do pGPro2 liberaram bandas de ± 2 Kb e 2,2 Kb, respectivamente (Figura 3.3). Apenas o clone 1.1 liberou um fragmento de tamanho esperado (1,4 kb). As seqüências dos clones que apresentaram boa qualidade foram obtidas quando o iniciador M13F foi utilizado. Esses clones denominados de 1.1 do pGPro1 e 19 do pGPro2 apresentaram identidade de 100% com o pUbi1Zm quando suas seqüências foram analisadas no BLAST, sendo seus E-values de 0,0. O clone 2.6 apresentou identidade de 33%, e seu alinhamento com a seqüência reversa complementar apresentou uma identidade com o pUbi1 de 95%, indicando que a ligação do inserto no vetor teve a orientação invertida. Na figura 3.4 observa-se a análise dos sítios de restrição dos clones sequenciados que confirma que os clones 1.1 e 19 estão ligados ao vetor na orientação correta, enquanto o clone 2.6 está na orientação invertida.

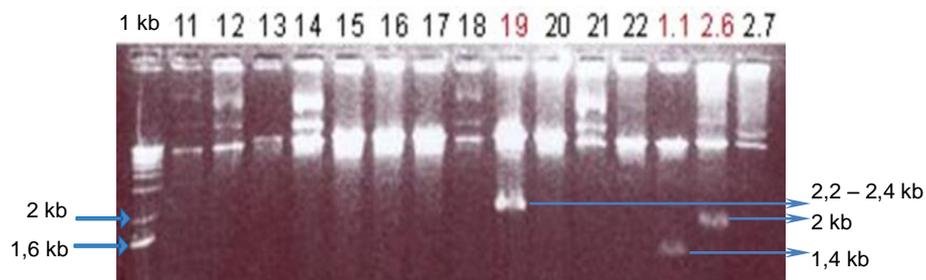


Figura 3.3 – Gel de agarose 0,8% com digestão dos clones do pGPro2 (linhas 11 a 22, 2.6 e 2.7) e pGPro1 (linha 1.1) digeridos com a enzima *SaI*

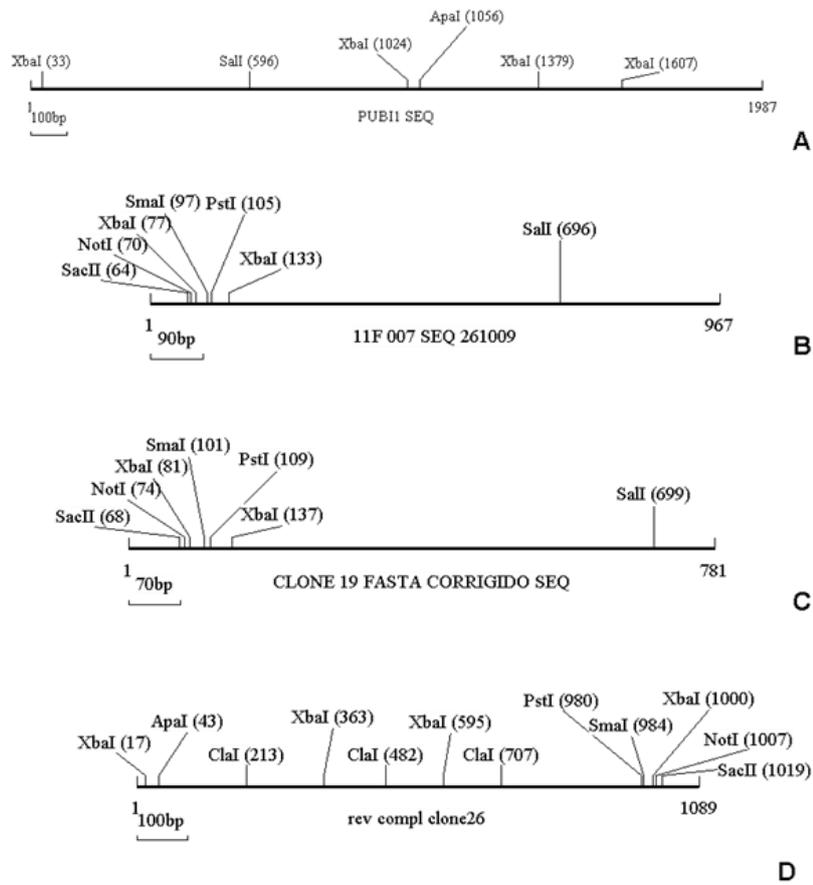


Figura 3.4 - Representação esquemática do mapa de sítios de restrição dos clones. (A) promotor pUbi1Zm; (B) Clone1.1 de pGPro1; (C) Clone19 de pGPro2; (D) clone2.6 de pGPro2 reverso complementar. Sequência correta do sítio múltiplo de clonagem do vetor, reconstruído em *PstI*

O fragmento correspondente ao pUbi1Zm de 2kb mostrado na figura 3.2 é o correspondente ao de 1.987 bases representado na figura 3.4A. Pode ser observado na figura 3.4 que os sítios das enzimas de restrição *XbaI* na posição 33 e *SalI* na 596, apresentam o mesmo padrão de localização dos clones 1.1 e 19, se levarmos em conta que aproximadamente 106 nucleotídeos presentes nos dois clones pertencem a sequênciado vetor. Conseqüentemente, os clones 1.1 e 19 apresentam a orientação correta esperada para que o pUbi1Zm possa dirigir a expressão dos genes *gus/gfp* (Figura 3.5).

A diferença de tamanho obtida do pGPro1pUbi1 (clone 1.1) de 1,4 kb e do pGPro2pUbi1 (clone 19) de 2,2 kb, em digestão com a enzima *SalI* é de 800 pb. Foi relatado que durante o processo de inserções de clonagem nos vetores pGPro e outros plasmídeos derivados do pGreen, que o plasmídeo pode obter, espontaneamente, um fragmento de cerca de 800 pb identificada como seqüência

de transposon 800bp-IS10 (comunicação pessoal Dr. Thilmony). O próximo passo foi testar se os vetores pGPro1pUbi1 e pGPro2pUbi1 funcionam em células de *B. brizantha*, para isso, foram bombardeados em suspensões celulares (SC), antes de serem introduzidos em *Agrobacterium tumefaciens*.

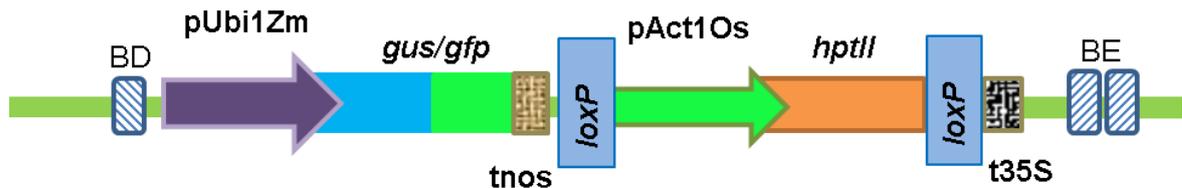


Figura 3.5 – Representação esquemática dos plasmídeos pGPro1pUbi1 (clone 1.1) e pGPro2pUbi1 (clone 19), contendo no T-DNA, após a borda direita (BD) o promotor de ubi1 de milho (pUbi1Zm) dirigindo a expressão dos genes repórteres *gus/gfp* com o terminador do gene *nos*. Entre os sítios *loxP*, de reconhecimento da recombinase CRE, estão o promotor de act1 de arroz (pAct1Os), dirigindo a expressão do gene de resistência a higromicina (*hptII*), seguido do terminador do CaMV35S e duas bordas esquerdas (BE) *in tandem*. As diferenças entre o pGPro1pUbi1 (clone 1.1) e pGPro2pUbi1 (clone 19) são duas mutações no promotor pAct1Os e uma inserção de 800pb no promotor pUbi1 ambas no pGPro2pUbi1

Curva de sobrevivência à higromicina

A análise da curva de sobrevivência de calos e brotos à higromicina mostra que na mais baixa concentração de higromicina testada (2,5 mg/L) observa-se uma redução de 50% na resposta morfogênica dos explantes (Figura 3.6). Estes explantes apresentaram resposta similar quanto à formação de brotos e calos embriogênicos até a concentração de higromicina de 10 mg/L (Figura 3.6). Nas concentrações de antibiótico de 15 e 20 mg/L os explantes mantiveram uma redução contínua na formação de brotos, mas houve um aumento abrupto na formação de calos embriogênicos. Esta resposta pode ser devida a um efeito de auxina do antibiótico observado em concentrações medianas, o que teria aumentado o número de calos embriogênicos como já descrito por outros autores (PADILLA; BURGOS, 2010). Em concentrações mais elevadas o efeito deletério da higromicina nos explantes foi drasticamente acentuado. Na concentração de 50 mg/L todos os explantes morreram.

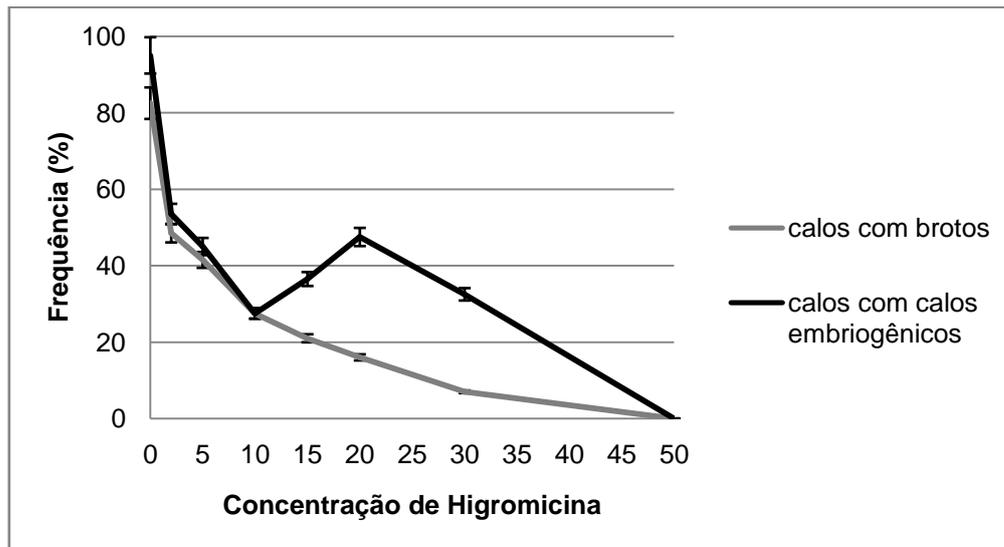


Figura 3.6 – Curva de sobrevivência de calos de *Brachiaria brizantha* em diferentes concentrações de higromicina nos meios de indução (M1.3) e regeneração (MS3). Resposta embriogênica obtida em frequência de calos que produziram brotos e calos que produziram calos embriogênicos durante a indução/regeneração

Concentrações de 15 a 30 mg/L de higromicina podem ser usadas para selecionar células transformadas, uma vez que nessas concentrações, apenas 20 a 5% dos calos embriogênicos formaram brotos. Embora a curva de sobrevivência dê um indicativo da concentração de agente seletivo a ser utilizada nos experimentos, a escolha da concentração deve também considerar a força do promotor usado para dirigir o gene marcador de seleção.

Embriões isolados vs. sementes maduras

Efeito do período de indução de embriogênese somática

Embriões bombardeados após um, três, cinco ou sete dias de cultura apresentaram aumento da expressão do gene *gus* até o quinto dia (39%), decaindo após sete dias em cultura (27%) (Tabela 3.2). Esse resultado pode ser devido ao aumento da proliferação celular na região escutelar entre três e cinco dias de indução, aumentando o número de células devido ao efeito do 2,4-D (CABRAL et al., 2011). No entanto, entre cinco e sete dias de indução foi observada uma diminuição da expressão do gene *gus*, o que pode ser devido ao fato de que em embriões isolados de *B.brizantha*, neste período de cultura, ocorre um aumento do volume das células devido à vacuolização (LENIS-MANZANO et al., 2010). A presença de

vacúolos pode dificultar o acesso das partículas bombardeadas ao núcleocelular, reduzindo o número de células transformadas. Observa-se que as células do coleóptilo ou os tecidos mais estruturados frequentemente apresentam expressão, sendo rara a presença da GUS em calos friáveis (Figura 3.7 A). As células mais apicais do coleóptilo não são competentes para a regeneração de embriões somáticos, que se dá a partir dos calos friáveis, no entanto, essas células apresentaram maior expressão de *gus*.

As sementes intactas bombardeadas após um, três, cinco ou sete dias de cultura apresentaram aumento contínuo da expressão do gene *gus* até uma semana, chegando a 78% (Tabela 3.2, Figura 3.7 B). A utilização de sementes maduras intactas além de reduzir o volume de trabalho, comparando com embriões excisados das sementes, apresentou o dobro de expressão em número de explantes expressando o gene *gus*, além de apresentar um padrão de expressão muito mais abrangente, sendo um ótimo sistema para testar transientemente vetores e construções via biobalística.

Tabela 3.2 - Expressão do gene *gus* em embriões isolados e sementes maduras intactas de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, cultivados em diferentes períodos em meio de indução M1.2, 48 horas após serem bombardeados com o plasmídeo pAct1-D

Explante	Período de cultivo anterior ao bombardeamento	Nº de explantes GUS +
Embriões isolados	1 d	9 (12%)
	3 d	13 (17%)
	5 d	29 (39%)
	7 d	20 (27%)
Sementes intactas	1 d	28 (37%)
	3 d	35 (47%)
	5 d	46 (61%)
	7 d	58 (78%)

Foram analisados 75 explantes por tratamento em teste histoquímico

Embriões bombardeados após três dias de cultivo apresentaram maior número e área de expressão do gene *gus*, quando comparado com os embriões cultivados por um dia antes do bombardeamento (Tabela 3.3), indicando que o período de indução é um importante parâmetro na transformação de braquiária, e confirmando os resultados acima. Nos embriões cultivados por um dia antes do bombardeamento, foi observada maior redução da expressão do gene *gus*, de 62%

para 10%, no intervalo de vinte dias de cultivo após o bombardeamento; enquanto nos embriões bombardeados após três dias de cultivo a redução da expressão foi muito menor, de 89% para 40%, no mesmo período. A manutenção da expressão no período de vinte dias em embriões induzidos por três dias pode ter ocorrido devido a uma maior proliferação celular nesses embriões antes do bombardeamento. A diminuição da expressão aos 20 dias indica baixa integração do plasmídeo no genoma da célula vegetal, sendo apenas expressão transiente do gene *gus*. Além disso, como preferencialmente as células que expressaram o gene *gus* de uma forma estável foram as do coleótilo do embrião apomítico (Figura 3.7 C), onde não ocorre regeneração e proliferação celular, e sim um alongamento das células, observa-se um padrão de expressão em linhas. O material bombardeado não foi submetido à pressão de seleção, tendo havido proliferação das células não transformadas, que são as células dos calos, que não apresentam expressão do gene *gus*, como mostrado no experimento anterior (Figura 3.7D). Após trinta dias no meio de indução, os calos restantes foram transferidos para meio de regeneração e produziram brotos, que foram individualizados e testados por PCR para a presença do gene *gus*, tendo sido todos negativos. Estes resultados apontam a necessidade de um sistema de transformação em células competentes para regeneração, assim como um sistema eficiente de seleção para favorecer a proliferação das células transformadas.

Tabela 3.3 - Expressão transiente e estável do gene *gus* em embriões isolados de semente madura de *Brachiaria brizantha* cultivados em meio de indução M1.2, por 1 ou 3 dias; e cultivados em mesmo meio após o bombardeamento por diferentes períodos (1, 10 ou 20 dias)

Tempo de indução	Período de cultivo pós bombardeamento					
	1 dia		10 dias		20 dias	
	% ± DP	Padrão expressão	% ± DP	Padrão expressão	% ± DP	Padrão expressão
1 dia	62 ± 5	2 + 11 ++ 2 +++	20 ± 0	3 + 2 ++	10 ± 0	2 + 1 ++
3 dias	89 ± 2	27 + 16 ++ 5 +++	83 ± 2	13 + 11 ++ 1 +++	40 ± 10	4 + 5 ++

Valores significam a média de duas repetições ± DP (desvio padrão). Padrão de expressão do gene *gus*: + = pontos isolados; ++ = agregados de pontos; +++ = áreas azuis

Calos embriogênicos

Calos de *B.brizantha* com 15 e 30 dias apresentaram expressão do gene *gus* 48 h após o bombardeamento com o plasmídeo pAHUG (Figura 3.7 E). Os calos que foram transferidos inicialmente para o meio de indução contendo 5 mg/L de higromicina, proliferaram calos embriogênicos em relação aos calos transferidos para meio de regeneração (MS3), que por sua vez, iniciaram rapidamente a diferenciação dos embriões somáticos, o que pode ter favorecido o desenvolvimento de embriões quiméricos (Figura 3.7 F). Os calos multiplicados e selecionados em higromicina (5mg/L) foram transferidos para o meio de regeneração com maior dosagem (10 mg/L) do antibiótico, onde após 30 dias formaram ou não brotos (Tabela 3.4). Maior número de brotações se desenvolveu em meio de seleção em culturas pré-induzidas por 15 e 30 dias, no entanto plântula transgênica foi regenerada apenas a partir de calos pré-induzidos por 30 dias antes do bombardeamento (Tabela 3.4). A pré-indução pode favorecer a obtenção de plantas transgênicas, aumentando o número de células embriogênicas nos calos. A maior proliferação dos calos transformados em meio M1.3, sob pressão de seleção, foi importante para aumentar o número de células transformadas. À medida em que as multibrotações atingiram uma altura de aproximadamente 2 cm no meio MS3, foram transferidas para alongamento no meio MMP com higromicina (20mg/L), e os brotos individualizados para o meio B também com antibiótico, onde os brotos desenvolveram raízes e foram aclimatados em casa de vegetação. Das plântulas aclimatadas apenas uma sobreviveu, apresentando sistema radicular mais desenvolvido. Os outros calos testados (7 e 15 dias) também apresentaram regeneração de plântulas na presença de antibiótico, quimeras, que não sobreviveram ao serem expostas ao agente seletivo.

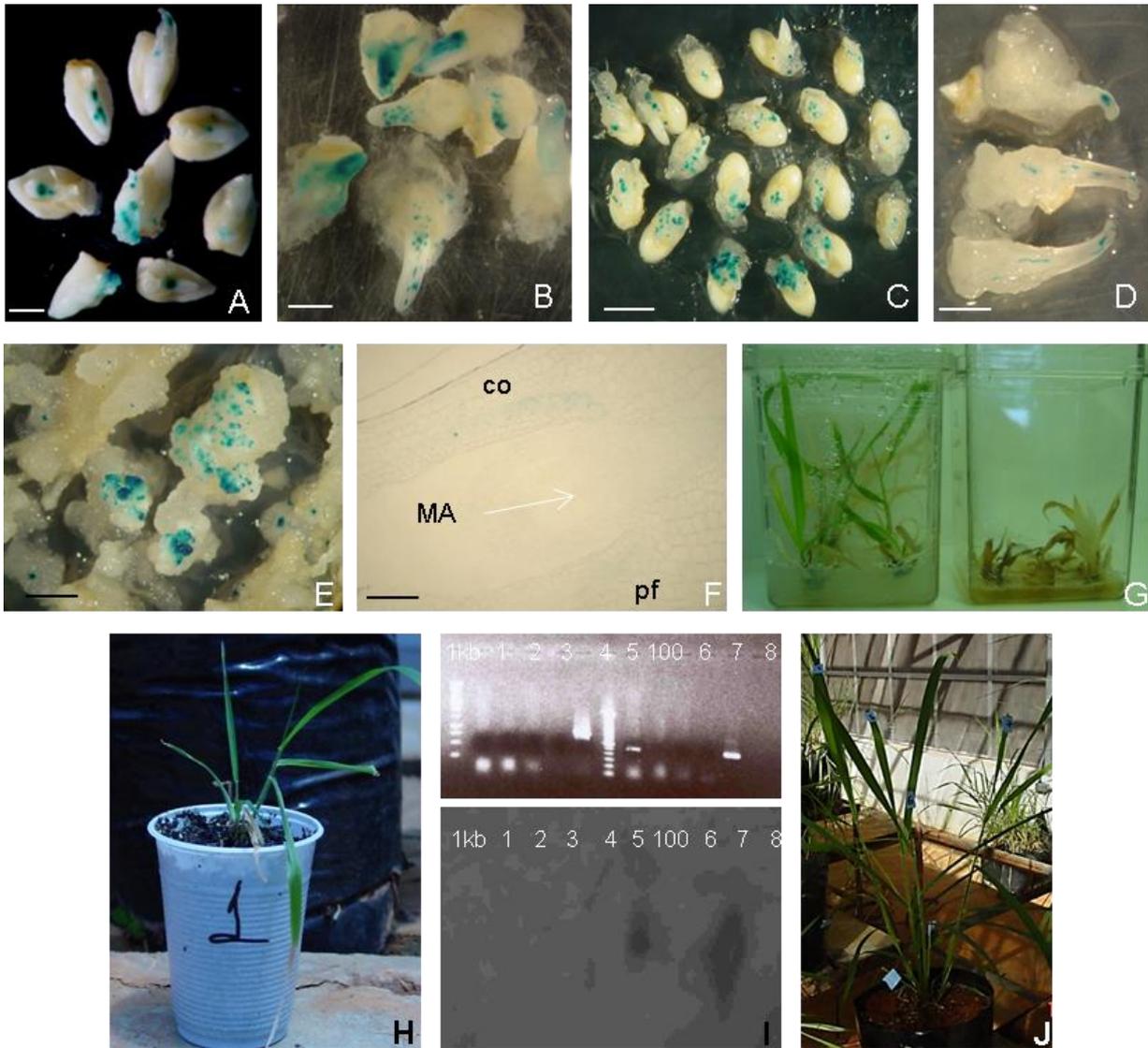


Figura 3.7 - Expressão do gene *gus* em *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. (A, B, D) embriões isolados de semente madura, em meio M1.2 bombardeados com o vetor pAct1-D, (A) após 3 d de cultura, (B) após 7 d, (D) embriões induzidos por 3 d antes do bombardeamento, e após, cultivados por 20 d; (C) sementes maduras intactas em meio M1.2, 48 h após bombardeamento, utilizando o vetor pAHC27; (E) calos induzidos por 30 d em meio M1.3; (F) micrografia de luz de corte longitudinal de calo embriogênico bombardeados com pAHUG e cultivado em meio de regeneração pós-bombardeamento, originando embrião somático quimérico expressando o gene *gus* no coleóptilo (co) e primórdio foliar (pf), mas sem expressão no meristema apical (MA); (G) plântulas resistentes a higromicina 20 mg/L (esq.) e controle de TG (dir.); (H) plântula resistente a higromicina aclimatada em casa de vegetação; (I) superior: gel de agarose com reação de PCR para a presença dos genes *gus* (1-5) e *hptII* (6-10), controle + plasmídeo pAHUG (5 e 10), coluna 7 planta positiva para o gene *hptII*; inferior: *Southern blot* com sinal positivo para o gene *hptII* na coluna 6; (J) planta com 2 meses de idade, analisada por PCR, apresentando várias folhas identificadas de onde amostras foram retiradas. Barras: A = 0,5 mm, B, D, E = 1 mm, C = 2 mm, F = 0,2 mm

Tabela 3.4 - Avaliação do efeito do período de calos de *Brachiaria brizantha* cultura em meio de indução antes do bombardeamento e a obtenção de plantas transgênicas

Período de indução	nº calos bombardeados	nº brotos resistentes a higromicina	Relação nº brotos/nº calos bombardeados	Planta transgênica
7 dias	390	6	0,01	-
15 dias	1280	39	0,03	-
30 dias	420	36	0,08	+

Análise da planta aclimatada (Fig 3.7) mostrou a presença do gene *hptII*, amplificando um fragmento de aproximadamente 473 pb, sendo que o gene *gus* não foi amplificado. A especificidade do fragmento do gene *hptII* foi confirmada por *Southern blot* contra uma sonda específica do gene *hptII* (Figura 3.7 J). O teste histoquímico para o gene *gus* foi negativo para essa plântula, tendo ocorrido a introdução apenas do gene *hptII*, podendo ter ocorrido uma quebra do plasmídeo, e provavelmente devido à pressão de seleção do antibiótico no meio o gene de seleção foi incorporado. Este resultado confirma a necessidade de um sistema de seleção para que haja integração de genes exógenos no genoma de *B. brizantha*. Outro fator que pode ter favorecido a transformação foi a plasmólise sofrida pelos calos pelo cultivo em meio com alta concentração de phytigel (0,7%), anterior ao bombardeamento. Em milho (VALDEZ; MADRIZ; RAMÍREZ, 2004), *Chloris gayana* (GONDO et al., 2009), e várias outras monocotiledôneas (WANG; GE, 2006; SOOD; BHATTACHARYA; SOOD, 2011), o uso de tratamento osmótico antes do bombardeamento aumentou a frequência de plântulas transformadas. A plântula *hptII* positiva (Figura 3.7G e H) foi transferida para terra e após 2 meses, foi realizada outra PCR usando fragmentos de 7 folhas individualizadas. O resultado da PCR foi negativo para o gene *hptII* (Figura 3.7I) em todas as folhas analisadas (resultado não mostrado). Provavelmente, a plântula *hptII* positiva era uma quimera e ao propagar-se por perfilhamento, como é o hábito de crescimento da braquiária, a parte transformada foi perdida.

Análises de plantas transgênicas de arroz revelaram que vários transformantes negativos para GUS no ensaio histoquímico, muitas vezes eram regenerantes resistentes a higromicina. Analisando esses transformantes por *Southern blot*, Hiei et al. (1997) observaram que todas as plantas continham cópias intactas do gene *hptII*, enquanto que cópias intactas do gene para GUS foram

encontrados em 7 de 20 plantas (35%). Assim, parte do plasmídeo foi perdido durante a transformação (HIEI; KOMARI; KUBO, 1997). A perda de parte do plasmídeo durante o processo de transformação/incorporação é um fenômeno frequentemente relatado em monotiledôneas, independentemente do método usado para transformação (KARAMI et al., 2009; LI et al., 2009; THILMONY et al., 2009; MOLLO et al., 2011; SOOD; BHATTACHARYA; SOOD, 2011; HARWOOD, 2012; TIE et al., 2012). Nas plantas analisadas de arroz, 65% continham apenas o gene *hptII* intacto, como ocorreu com a planta regenerada de *B. brizantha* resistente a higromicina. Estes resultados indicam que a pressão de seleção é fundamental para que essas plantas incorporem transgenes no seu genoma.

Suspensões celulares

Suspensões celulares (SC) bombardeadas com os plasmídeos binários pGPro1pUbi1 e pGPro2pUbi1 (Figura 3.5) apresentaram expressão do gene *gus*, indicando que as construções foram bem sucedidas (Tabela 3.5 e Figura 3.8A, D e E). As SC bombardeadas a 1.200 PSI, com os dois plasmídeos, tiveram um aumento na expressão percentual de três vezes, no caso do pGPro1pUbi1, e de 10 vezes no caso do pGPro2pUbi1. No entanto, apesar do aumento da expressão de *gus* 24 h após o bombardeamento, as SC oxidaram muito, e após um mês de cultivo, apenas o controle de regeneração sobreviveu. Quando pGPro2pUbi1 foi bombardeado em SC, a expressão de *gus* foi muito similar à de pGPro1pUbi1 nas duas condições de pressão testadas. Isto indica que a inserção espontânea de 800 pb que ocorreu na extremidade 3' do promotor pUbi1 inserido no pGPro2 não alterou a função do promotor. Para estudos de expressão transiente de genes ou teste de vetores usando SC de *B. brizantha*, a condição de 1.200 PSI favoreceu a transformação genética.

SC induzidas e mantidas em meio NBBAP (pH 4) após serem bombardeadas com o plasmídeo pGPro1pUbi1 na condição de 900 psi, apresentaram expressão transiente do gene *gus* (Figura 3.8 A) após 24 h. Estas SC após terem sido mantidas por duas semanas em NBBAP com higromicina (10 mg/L), e transferidas para DD1 líquido (10 mg/L higromicina) e MPR sólido (30 mg/L higromicina), regeneraram UE resistentes ao antibiótico (Figura 3.8 B). Estas UE mantiveram sua capacidade de proliferação em meio de regeneração com higromicina (20 mg/L) após sucessivos

subcultivos ao longo de 10 meses (Figura 3.8 C). Mostraram-se positivas para a expressão da GUS (Figura 3.8 D, E) e pela presença do gene *gus* detectado por PCR (Figura 3.8 G), e a especificidade da banda amplificada foi confirmada por *Southern Blot* (Figura 3.8 H).

Tabela 3.5 – Expressão do gene *gus* em suspensões celulares de *Brachiaria brizantha* bombardeadas com diferentes plasmídeos sob pressão de 900 ou 1.200 PSI e um tiro por placa, analisadas 24 horas após bombardeamento. Meio de bombardeamento sem osmóticos

Plasmídeo	Pressão (PSI) biobalística	Número total de placas	Média do número de agregados celulares	
			sem <i>gus</i>	com <i>gus</i> (%)
pGPro1pUbi1	900	12	204	27 (12)
	1200	12	210	97 (32)
pGPro2pUbi1	900	12	186	8 (4)
	1200	12	230	154 (40)
pAHC27	900	38	665	123 (16)
pAct1D	900	18	315	93 (23)
Média de dois experimentos				

Também foram positivas para a presença do gene *hptII* (Figura 3.8 G e I), indicando que o T-DNA do plasmídeo estava intacto na célula vegetal. Para favorecer a regeneração de brotos a partir das UE transformadas, o antibiótico foi removido do meio de regeneração, quando a proliferação das mesmas se intensificou (Figura 3.8 F). As UE apresentaram um aspecto de vitrificação após tantos subcultivos, regenerando três brotos quando transferidas para meio MMP (meio de manutenção de plantas). Estes foram analisados por teste histoquímico e PCR, tendo sido negativos para a presença/expressão de *gus* ou *hptII*.

Observa-se várias intensidades de expressão da proteína GUS nas SC (Figuras 3.8 D e E), ou seja, alguns agregados celulares e UE apresentam-se completamente azuis, outros apenas parcialmente azuis, enquanto outros não apresentam nenhuma reação, indicando a ausência de expressão do gene *gus*. Isto indica que as células transformadas podem estar desintoxicando o meio onde as não transformadas, que tem uma grande capacidade proliferativa, continuam se mantendo, mesmo na presença do antibiótico.

Quando o material foi transferido para meio sem higromicina observou-se uma proliferação celular, como demonstrado na Figura 3.8 F, e apenas as UE não transformadas regeneraram brotos. A triagem das células transgênicas parece estar sendo parcial, levando à regeneração de escapes e quimeras.

Além disso, as UE transformadas não regeneram, mostrando que o antibiótico pode estar tendo um efeito deletério na regeneração das mesmas. A inibição da regeneração de células/tecidos transformados pode promover o crescimento de células/tecidos não transformados mesmo sob pressão seletiva que, posteriormente, resultam na produção de brotos escape (DAN, 2008).

Estas dificuldades podem ser, em parte, devido a um pressuposto incorreto sobre o modo de ação dos antibióticos, porque, na verdade, não se sabe exatamente o que os antibióticos aminoglicosídeos fazem na célula vegetal, e como isso afeta os protocolos de transformação/regeneração. No caso de cotilédones de beterraba açucareira, a higromicina foi mais tóxica do que a canamicina e neomicina, de 20 a 30 vezes, respectivamente. Além disso, a canamicina afetou a proliferação de calos em explantes de folha e a capacidade morfogênica destas de formar brotos, tendo sido atribuída a um aumento na metilação do DNA em resposta ao antibiótico. Uma dose de antibiótico aplicada exogenamente imitaria um ataque de patógeno, induzindo uma reação de defesa e hipermetilação, com a morte celular e subsequente diminuição da capacidade de regeneração. Em algodão, o efeito da canamicina reduziu ou mesmo inibiu a iniciação e desenvolvimento de embriões somáticos no estágio de proembrião e embrião globular, tendo aumentado no estágio de embrião cotiledonar (revisado por PADILLA; BURGOS, 2010).

Em suspensões embriogênicas de banana, um efeito negativo do antibiótico também foi observado na diferenciação de embriões somáticos, retardando a obtenção de plântulas (GHOSH et al., 2009). Em *B. brizantha*, a higromicina parece estar impedindo o desenvolvimento dos proembriões presentes nas unidades embriogênicas resistentes ao antibiótico. Uma estratégia para solucionar este problema seria introduzir o gene *nptII* dirigido pelo promotor de Ubi1 de milho, que é forte em *B. brizantha*, e selecionar as células transformadas em paramomicina ou geneticina, reduzindo ao máximo o tempo de exposição das SC ao antibiótico.

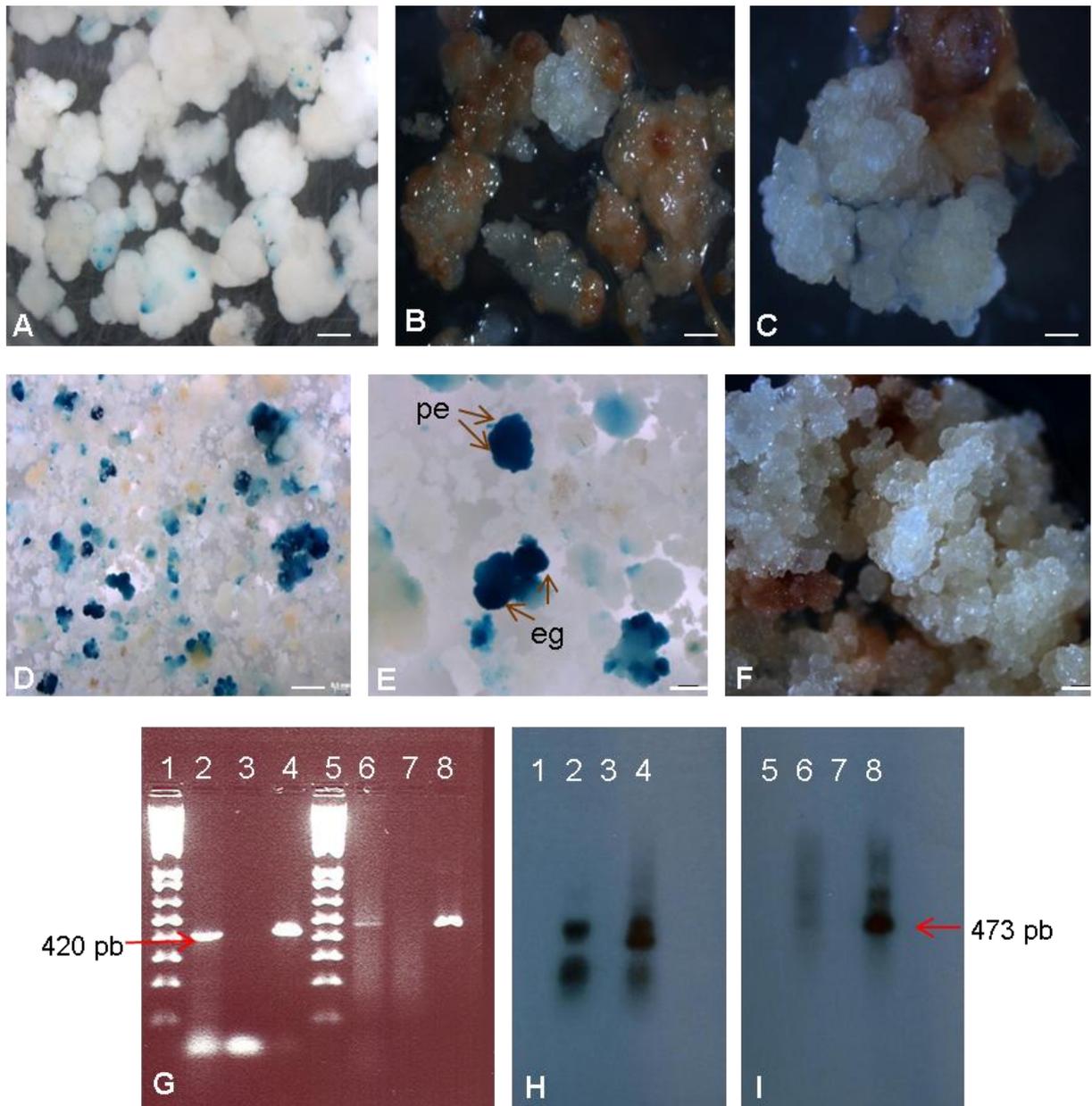


Figura 3.8 – Suspensões celulares de *Brachiaria brizantha* obtidas em meio NBBAP pH 4 após bombardeamento com pGPro1pUbi1. (A) expressão do gene *gus* 24 h pós-bombardeamento; (B) estruturas resistentes a higromicina (30 mg/L) em meio de pré-regeneração (MPR); (C) estruturas resistentes a higromicina (20 mg/L) em meio de regeneração (MR); (D) expressão do gene *gus* em UE após 10 meses de cultivo em MR na presença de higromicina (20 mg/L); (E) detalhe aumentado de D mostrando UE com proembriões (pe) e embriões globulares (eg) expressando o gene *gus*; (F) crescimento de estruturas resistentes a higromicina após transferência para MR sem higromicina; (G) gel de agarose 1% com reações de PCR para os genes *gus* (2 a 4) e *hptII* (6 a 8), sendo as colunas nº 1 e 5 correspondentes ao marcador de peso molecular (1 kb), colunas nº 2 e 6 a DNA de calos resistentes a higromicina, colunas nº 3 e 7 controle negativo (água) e colunas nº 4 e 8 controles + usando o plasmídeo pGPro1pUbi1; (H) *Southern blot* do gel de PCR correspondente as colunas de nº 1 a 4, hibridizado com sonda para o gene *gus*; (I) *Southern blot* do gel de PCR correspondente as colunas de nº 5 a 8, hibridizado com sonda para o gene *hptII*. Barras: A, B, D = 1 mm e C, E, F = 0,5 mm

Os plasmídeos pAct1D e pAHC27 (Figura 3.1) apresentaram expressão de *gus* muito similar entre eles (Tabela 3.5). SC bombardeadas com pAHC27 resultaram na regeneração de três multibrotações, sem pressão de seleção, das quais dois brotos foram positivos para a expressão do gene *gus* (Figura 3.9). A eficiência de regeneração nesse caso foi de 30 brotos/0,5 mL VCS ou 200 mg. Desses 30 brotos obtidos, 15% eram transformados, representando cerca de 85% de escapes.

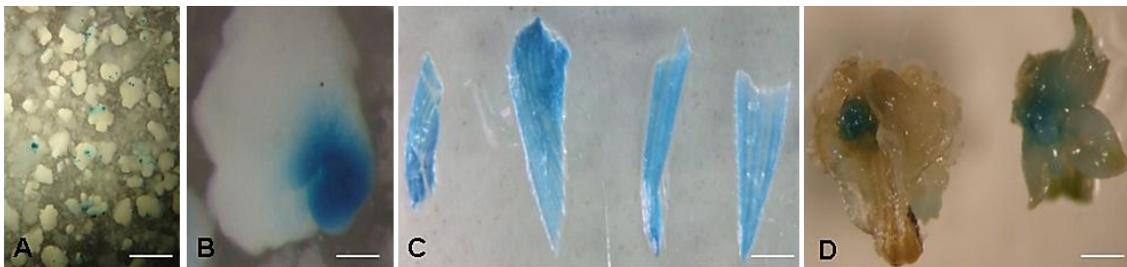


Figura 3.9 - Expressão do gene *gus* em *Brachiaria brizantha* após bombardeamento com o plasmídeo pAHC27. (A e B) SC 24 h após bombardeamento; (C) fragmentos de folhas de brotos obtidos em meio MS3 sem higromicina; (D) segmentos basais de plântulas com meristema apical azul. Barras: A = 2 mm, B = 0,2 mm, C e D = 1 mm

Até recentemente, SC eram relatadas como explantes de baixa frequência de transformação, uma vez que eventos de transformação ocorriam apenas em grandes aglomerados celulares (OZAWA; TAKAIWA, 2010). A condição hídrica das SC tem sido indicada como a responsável pela baixa frequência de transformação. Arroz, assim como *B. brizantha* (CABRAL et al., 2011), tende a perder a capacidade de regeneração em função da duração da cultura. Calos de arroz resistentes a higromicina foram transferidos para meio de regeneração, oriundos de SC subcultivadas uma vez, e regeneraram plantas albinas em baixa frequência. Entretanto, SC subcultivadas por cinco vezes regeneraram plantas albinas em alta frequência (40%). Ozawa e Takaiwa (2010) sugeriram que SC de arroz de 1 a 4 semanas seriam mais adequadas para transformação para evitar plantas com sementes de baixa fertilidade. É possível que a manutenção de SC de *B. brizantha* por um período mais longo tenha levado as UE a se manterem em fase de

multiplicação, devido ao longo período de exposição ao 2,4-D. A redução do período de subcultivos anterior à transformação é recomendável para superar este obstáculo e permitir a regeneração de plântulas a partir das UE transformadas.

Quando as SC de *B. brizantha* foram plaqueadas em meio 24 h antes do bombardeamento, estas apresentaram-se muito plasmolisadas e oxidadas, independentemente das condições testadas. Os melhores resultados, em termos de viabilidade das SC, foram obtidos quando estas foram plaqueadas 4 h antes do bombardeamento. Além disso, osmóticos inertes como sorbitol e manitol foram testados juntos ou separadamente, assim como, sacarose 12% no meio de bombardeamento, tendo aumentado a expressão transiente do gene *gus*, no entanto, reduziram muito a viabilidade das células (dados não apresentados). No caso de SC de *B. brizantha*, a pressão osmótica do meio de bombardeamento que contém 3% de sacarose e 0,7% de phytigel, é o suficiente para plasmolisar as células de forma reversível. Outro fator importante foi o período de plaqueamento das células após o bombardeamento. Manter as células, depois do bombardeamento, por 48 h no mesmo meio aumentou a expressão do gene *gus*, provavelmente porque aumentou o número de divisões das células transformadas, no entanto, reduziu sobremaneira a viabilidade das células devido à oxidação. A expressão gênica e a reversibilidade do estresse causado às células foi favorecida por um período de 24 h no meio onde estas foram bombardeadas. Resultados semelhantes de período de tratamento osmótico pré e pós bombardeamento foram relatados para SC embriogênicas de milho (VAIN; McMULLEN; FINER, 1993) e calo escutelar de trigo (PERL et al., 1992) e *Paspalum notatum*(SMITH et al., 2002). Em grama rhodes o estresse osmótico e a pré-cultura afetou a taxa de expressão transiente de *gus*. A maior expressão foi em 1,5 M de osmótico e 7 d de pré-cultura, mas como o tratamento osmótico reduziu a proliferação celular e induziu necrose, osmótico a 1,2M foi utilizado para obter transformantes por biobalística (GONDO et al., 2009) Este efeito positivo do tratamento osmótico pode ser devido à plasmólise, que por manter o potencial de pressão de células feridas reduz os danos celulares, impedindo a extrusão de citoplasma de células bombardeadas (FINER; McMULLEN, 1991).

O estágio de desenvolvimento dos tecidos-alvo é um dos fatores mais importantes, que influencia deveras a frequência de transformação (SAIRAM et al.,

2005; OZAWA; TAKAIWA, 2010; MA et al., 2011; SOOD; BHATTACHARYA; SOOD, 2011; PALOMO-RÍOS et al., 2012). Em SC de *B. brizantha* após a fase *lag* de quatro semanas em cultura líquida, observou-se que a fase log inicia-se a partir da sexta semana, quando as células estão numa taxa de divisão acelerada (Figuras 2.4, 2.5 e 2.6), sendo o período preciso para serem usadas no bombardeamento.

De 46 plantas de *Typha latifolia*, monocotiledônea, regeneradas em higromicina (20 mg/L), apenas 13 apresentaram o gene *hptII* (NANDAKUMAR; CHEN; ROGERS, 2005). A adição de higromicina no meio de regeneração resultou que 85% dos regenerantes expressavam GUS estavelmente em arroz (KOMARI et al., 1996). Em centeio (*Secale cereale*) plantas transgênicas obtidas apresentaram fenótipo normal e produziram sementes férteis, que segundo Popelka e Altpeter (2003), pode ter sido consequência do curto período na cultura *in vitro*. Além disso, eles afirmam que a seleção em paramomicina exclusivamente durante a regeneração permitiu a recuperação de eventos transgênicos sem interferir na embriogênese somática (POPELKA; ALTPETER, 2003). A maioria dos relatos de obtenção de plantas transgênicas indica a seleção de transformantes em higromicina como muito eficiente, no entanto, quando números são citados, é sempre notória a ocorrência de escapes. Yang et al. (2004) demonstraram a importância da frequência de subcultivos de calos de arroz resistentes à higromicina para aumentar tanto a viabilidade como a regeneração desses calos. Dez a 15 dias foi o intervalo máximo que eles encontraram para a primeira seleção, depois subcultivos sucessivos de 4-12 dias favoreceram a diferenciação de 80% dos calos resistentes em plantas (YANG et al., 2004).

O equilíbrio entre manter as SC de braquiária em cultura por um período mínimo no qual elas atinjam a fase exponencial de divisão, para que sejam competentes para transformação, e o menor tempo possível na seleção em higromicina no pós-bombardeamento, para favorecer a divisão das células transformadas e evitar quimeras e escapes, é o próximo desafio. Testar além de sucessivos, frequentes e curtos subcultivos em paramomicina e geneticina, em paralelo com higromicina, pode ser uma estratégia a ser adotada.

Apesar de Ishigaki et al. (2012) terem obtido plantas transgênicas de *Brachiaria ruziziensis* via biobalística, já foi demonstrado também que a competência para regeneração e transformação genética de plantas é totalmente

dependente do genótipo (VASIL, 2005; REDHA; SULEMAN, 2010; SOOD; BHATTACHARYA; SOOD, 2011; HARWOOD, 2012; TIE et al., 2012). *Brachiaria brizantha* cv. Marandu é mais recalcitrante à transformação genética, tanto que não há relatos na literatura atual sobre transformação desta cultivar.

5.4 Conclusões

- ✓ Os plasmídeos pGPro1pUbi1 (clone 1.1) e pGPro2pUbi1 (clone 19) foram obtidos e funcionaram em células de *B. brizantha*.
- ✓ Foi obtido um sistema de expressão transiente para testar vetores e construções usando sementes maduras intactas para gramíneas via biobalística.
- ✓ Calos bombardeados com pAHUG originaram plântulas resistentes a higromicina, tendo sido confirmada a presença do gene *hptII* por PCR, sem o gene *gus*.
- ✓ Suspensões celulares bombardeadas apresentaram expressão transiente e estável dos genes *gus* e *hptII*. O sistema de SC transformadas via biobalística foi eficiente.
- ✓ A higromicina parece estar impedindo o desenvolvimento de proembriões resistentes ao antibiótico.

Capítulo IV: Transformação genética de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu e *Oryza sativa* cv. Primavera via *Agrobacterium tumefaciens*

Resumo

Brachiaria brizantha cv. Marandu é uma importante gramínea forrageira apomítica, que se reproduz quase que exclusivamente por aposporia. Assim sendo, os embriões de suas sementes são clones da planta-mãe. A transformação genética é uma opção para introdução de características agrônômicas nesta cultivar. *Oryza sativa* é uma planta modelo para estudos funcionais em monocotiledôneas, sendo a cultivar Primavera um genótipo elite comercial. A transformação genética mediada por *Agrobacterium* tem sido preferida para gramíneas e cereais depois que as primeiras plantas de arroz e milho foram transformadas por esta técnica. Culturas embriogênicas continuam sendo os alvos mais utilizados para a transformação de cereais e gramíneas. No presente trabalho, suspensões celulares embriogênicas de *B. brizantha* e unidades embriogênicas de arroz foram usadas com os objetivos de caracterizar a embriogênese somática na cultivar Primavera, identificar a suscetibilidade das espécies a *Agrobacterium*, e obter plantas transgênicas dessas cultivares. Para isto, as linhagens de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 e LBA4404 foram transformadas com pGPro1pUbi1 e experimentos de agroinfiltração para testar parâmetros como sonicação/infiltração, uso de silwet L-77, período de co-cultura e dois meios de indução foram realizados. Além disso, foram testados diversos fatores da co-cultura que afetam diretamente a suscetibilidade das células vegetais, assim como, fatores para ativar os genes de virulência (*vir*) da *Agrobacterium*. O sistema de embriogênese somática da cv. Primavera via UE foi caracterizado, e demonstrou ser ineficiente. A linhagem EHA105 é capaz de transformar células de unidades embriogênicas da cultivar Primavera. A agroinfiltração é um sistema eficiente e simples para expressão transiente do gene repórter *gus* nas cultivares Primavera de arroz e Marandu de *B. brizantha*. Suspensões celulares de *B. brizantha* são suscetíveis à transformação genética por *Agrobacterium tumefaciens*.

Palavras-chave: gramínea forrageira. genes marcadores. expressão gênica. seleção em higromicina. escapes. embriogênese somática.

Abstract

Brachiaria brizantha cv. Marandu is an important apomictic forage grass that reproduces almost exclusively by apospory; therefore, the embryos developed in the seeds are clones of the mother plant. Apomixis and differences in ploidy level impair crossings, and consequently, traditional breeding. Genetic transformation is an option for introducing agronomic traits in this cultivar. *Oryza sativa* is a model plant for functional genomic studies in monocot, with cv. Primavera being a commercial elite genotype. Genetic transformation mediated by *Agrobacterium* has been preferred for grasses and cereals since the first rice and maize plants were transformed by this technique. Embryogenic callus are still the most used targets for genetic transformation of cereals and grasses. In this study, embryogenic cell suspension cultures of *B. brizantha* and rice embryogenic units were used with the objective of characterizing somatic embryogenesis in cv. Primavera, identifying the susceptibility of these species to *Agrobacterium*, and obtaining transgenic plants of these cultivars. For this, *Agrobacterium tumefaciens* strains EHA105 and LBA4404 were transformed with pGPro1pUbi1 and agroinfiltration experiments for testing parameters such as sonication/infiltration, use of Silwet L-77, co-culture period, and two induction media were performed. Moreover, several factors that directly affect the susceptibility of plant cells were tested in co-culture as well as factors to activate the *Agrobacterium* virulence genes (*vir*). The embryogenic unit system of cv. Primavera has been characterized and shown to be inefficient. The strain EHA105 is capable of transforming Primavera cells. The agroinfiltration is an efficient and simple system for transient gene expression in Primavera and Marandu cultivars. *B. brizantha* suspension cells are susceptible to *Agrobacterium tumefaciens* genetic transformation.

Keywords: forage grass. marker gene. gene expression. hygromycin selection. escapes. somatic embryogenesis.

6.1 Introdução

Brachiaria brizantha cv. Marandu é uma importante gramínea forrageira tropical que além de ocupar milhões de hectares no Brasil, é tolerante à principal praga das pastagens, a cigarrinha (FELISMINO et al., 2012). Esta cultivar apresenta reprodução apomítica, e apesar da apomixia ser facultativa, se reproduz quase que exclusivamente por aposporia (VALLE; SAVIDAN, 1996; DUSI, 1999; ALVES; CARNEIRO; ARAÚJO, 2001). Como consequência, os embriões das sementes apomíticas são propágulos da planta-mãe. Além da apomixia, ocorre nesta espécie a diferença de ploidia entre a planta apomítica, que é tetraplóide, e o acesso sexual que é diplóide, impedindo os cruzamentos e desta forma, o melhoramento (VALLE; SAVIDAN, 1996). A transformação genética é uma opção para introdução de características agrônomicas ou ecológicas desejáveis nesta espécie (DALTON et al., 2003). Além disso, a transformação genética de *B. brizantha* permitirá análises funcionais de genes candidatos relacionados à apomixia (RODRIGUES et al., 2003; SILVEIRA et al., 2011) por superexpressão e silenciamento (LI et al., 2010).

O arroz (*Oryza sativa*) é uma monocotiledônea de genoma pequeno, diplóide e com metodologia para transformação genética definida para algumas cultivares (HIEI et al., 1994, SALLAUD et al., 2003). As características genéticas dessa espécie são bastante conhecidas, com mapa físico densamente saturado com marcadores moleculares apresentando grandes similaridades de seqüências de genes, estrutura e função gênica com outros cereais e gramíneas (UPADHYAYA, 2007). Por ser diplóide, a análise da expressão dos genes introduzidos em arroz é facilitada. Estes fatores fazem de *Oryza sativa* um modelo de estudos funcionais para plantas monocotiledôneas. Entretanto, a cultura *in vitro* e a transformação genética são metodologias extremamente dependentes da resposta de cada genótipo (TIE et al., 2012). No Brasil, a cultivar Primavera é um genótipo elite comercial amplamente cultivada em terras altas, ou condições de sequeiro (FONSECA et al., 2007). Apesar de pertencer ao grupo Japônica, a cv. Primavera é classificada como Japônica tropical, apresentando recalcitrância similar às cultivares do grupo Indica, que engloba as cultivares mais recalcitrantes de *O. sativa* (RASHID et al., 1996; TIE et al., 2012).

A transformação genética mediada por *Agrobacterium* é preferível por causa do baixo custo, facilidade da técnica, da não necessidade de aparelhos

especializados, da alta eficiência de transformação, da capacidade de transferir relativamente grandes segmentos de DNA com bordas definidas, do mais baixo número de cópias dos transgenes inseridos no genoma do hospedeiro e da esperada hereditariedade mendeliana dos transgenes (SHARMA; BHATNAGAR-MATHUR; THORPE, 2005; WANG; GE, 2006; SOOD; BHATTACHARYA; SOOD, 2011). É muito importante estabelecer um protocolo eficaz e que possa ser amplamente utilizado para diversas variedades de arroz como no caso da Primavera, e estendê-lo para outras espécies que sejam recalcitrantes como *B. brizantha*.

Culturas embriogênicas ou embriões imaturos continuam sendo os alvos mais utilizados para a transformação de cereais e gramíneas forrageiras (HARWOOD, 2012). Elevada taxa de divisão celular nos explantes usados para transformação genética de monocotiledôneas é considerada um pré-requisito chave para que a integração do DNA exógeno ocorra (HIEI; KOMARI; KUBO, 1997; VASIL, 2005), e a rápida proliferação celular é uma característica de suspensões celulares. Sendo assim, suspensões celulares (SC) embriogênicas e unidades embriogênicas (UE) podem ser uma das melhores fontes de explantes para obtenção de plantas transgênicas em monocotiledôneas.

Até o momento não existe relato na literatura de transformação genética de *B. brizantha*. Ishigaki et al. (2012) relataram a obtenção de plantas transgênicas da espécie *Brachiaria ruziziensis* usando bombardeamento de calos embriogênicos com um vetor contendo os genes marcadores de resistência ao herbicida fosfinotricina (*bar*) e gene repórter *gus*, ambos sob controle do pUbi1Zm. As plantas transgênicas tiveram fenótipo normal e floresceram, mas não produziram sementes. Plantas férteis foram obtidas de calos que haviam sido duplicados por colchicina.

No presente trabalho foi utilizado o vetor binário pGPro1 (THILMONY et al., 2006), que contém o gene repórter fusionado *gus/egfp*, que codifica para ambas as proteínas GUS, β -glucuronidase, e eGFP, *enhanced green fluorescent protein*, sob o controle do promotor de Ubi1 de milho, pUbi1Zm. O gene marcador de seleção *hptII* é dirigido pelo promotor do gene de actina1 de arroz, pAct1Os. O sistema vetorial pSoup/pGPro1 compreende pSoup como plasmídeo *helper* que contém o gene RepA que atua em *trans* sobre a origem de replicação (Ori pSA) do pGPro1. pGPro1pUbi1 é o vetor binário que tem no T-DNA, após a borda direita (BD), os genes marcadores dirigidos por promotores de monocotiledôneas como descrito

acima. O vetor binário contém os sítios *loxP* de reconhecimento da recombinase CRE, entre o gene de resistência a higromicina (*hptII*), para remoção deste gene do genoma dos transformantes, numa segunda etapa de transformação. Além disso, o T-DNA do pGPro1 apresenta duas bordas esquerdas (BE) *in tandem* para favorecer o reconhecimento do ponto de clivagem do T-DNA a ser transferido. É comum encontrar sequências do esqueleto do vetor binário além da borda esquerda, inseridas no genoma dos transformantes (HIEI et al., 1994, 1997). A marca de seleção do vetor binário em bactérias é o gene *nptI* que confere resistência a canamicina.

As linhagens de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 e LBA4404 têm sido as mais usadas para transformação de arroz, sendo a EHA105 a mais eficiente no caso da cultivar Nipponbare. A eficiência de transformação varia muito em função da combinação da linhagem com o vetor utilizado (HIEI et al., 1994, 1997).

Sistemas de expressão transiente de genes são ideais para avaliação e comparação de construções gênicas e vetores (ALTPETER et al., 2005; VANDERGHEYNST; GUO; SIMMONS, 2008; LI et al., 2009; CHEN et al., 2010), sendo importante para a produção de proteínas recombinantes, mesmo antes da expressão estável em plantas. A agroinfiltração é um método de expressão transiente no qual a *Agrobacterium tumefaciens* é infundida na planta. O sistema de agroinfiltração pode ser muito útil para indicar a suscetibilidade da planta a ser transformada, visto que, no processo de transformação, *A. tumefaciens* tem a habilidade de transferir o transgene para o núcleo de células de plantas compatíveis ou suscetíveis, sendo possível a expressão transitória desse transgene.

Vários tratamentos usando ferimentos e aditivos têm demonstrado o aumento da expressão transiente de genes pela transformação genética via *Agrobacterium*. Transformação por *Agrobacterium* auxiliada por sonicação (SAAT=sonication assisted *Agrobacterium* transformation), combinação de sonicação e infiltração a vácuo, compostos tiol, surfactantes ou emolientes e agitação em Vortex com carborundum foram aplicadas a uma variedade de explantes de espécies diferentes para aumentar a expressão transiente de genes marcadores repórteres (revisado por CHEN et al., 2010). Um sistema de agroinfiltração fácil, rápido e econômico de expressão transiente de gene baseado na germinação de embriões de *Arabidopsis*, tomate, tabaco, arroz e *Panicum virgatum* cocultivadas com *A. tumefaciens* (FAST=*fast Agro-mediated seedling transformation*) foi demonstrado (LI et al., 2009).

Os autores mostraram a utilização do sistema FAST para teste de promotor, localização de proteínas e estudos de interação proteína-proteína.

Os objetivos deste trabalho foram (1) caracterizar a embriogênese somática na cultivar Primavera, (2) identificar a suscetibilidade de *B. brizantha* cv. Marandu e *O. sativa* cv. Primavera a *Agrobacterium tumefaciens*, (3) estabelecer sistemas de expressão transiente de genes para as cultivares Marandu de *B. brizantha* e Primavera de *O. sativa* via *Agrobacterium* e (4) obter plantas transgênicas dessas cultivares. Parâmetros como sonicação/infiltração, uso de silwet L-77, período de co-cultura, duas linhagens de agrobactérias e dois meios de indução, foram testados para estabelecer o sistema FAST da agroinfiltração como sistema de expressão transiente. Neste trabalho foram testados diversos fatores da co-cultura que afetam diretamente a suscetibilidade das células vegetais, assim como, fatores para ativar os genes de virulência (*vir*) da *Agrobacterium*.

6.2. Material e Métodos

Material Vegetal

Sementes maduras de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu (BRA000591) foram gentilmente cedidas pela Embrapa Gado de Corte e sementes maduras de *Oryza sativa* cv. Primavera foram gentilmente cedidas pela Embrapa Arroz e Feijão.

As sementes foram descascadas e selecionadas manualmente. Foram imersas em etanol (70%, v/v) por 5 min, e em seguida em solução contendo hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) contendo três gotas de Tween™ 20, por 30 min, sob agitação. Após esta etapa, as sementes foram lavadas seis vezes em água destilada autoclavada e em seguida secas sobre papel filtro.

Linhagens desarmadas de Agrobacterium tumefaciens

- EHA105 linhagem hipervirulenta derivada da EHA101 (HOOD et al., 1986, 1993). Contém plasmídeo desarmado pTiBo542 (genes *virG* e *virA*) - Agropina.
- LBA4404 linhagem com resistência a Sm/Sp no plasmídeo de virulência (HOEKEMA et al., 1983) – Octopina.

Plasmídeos

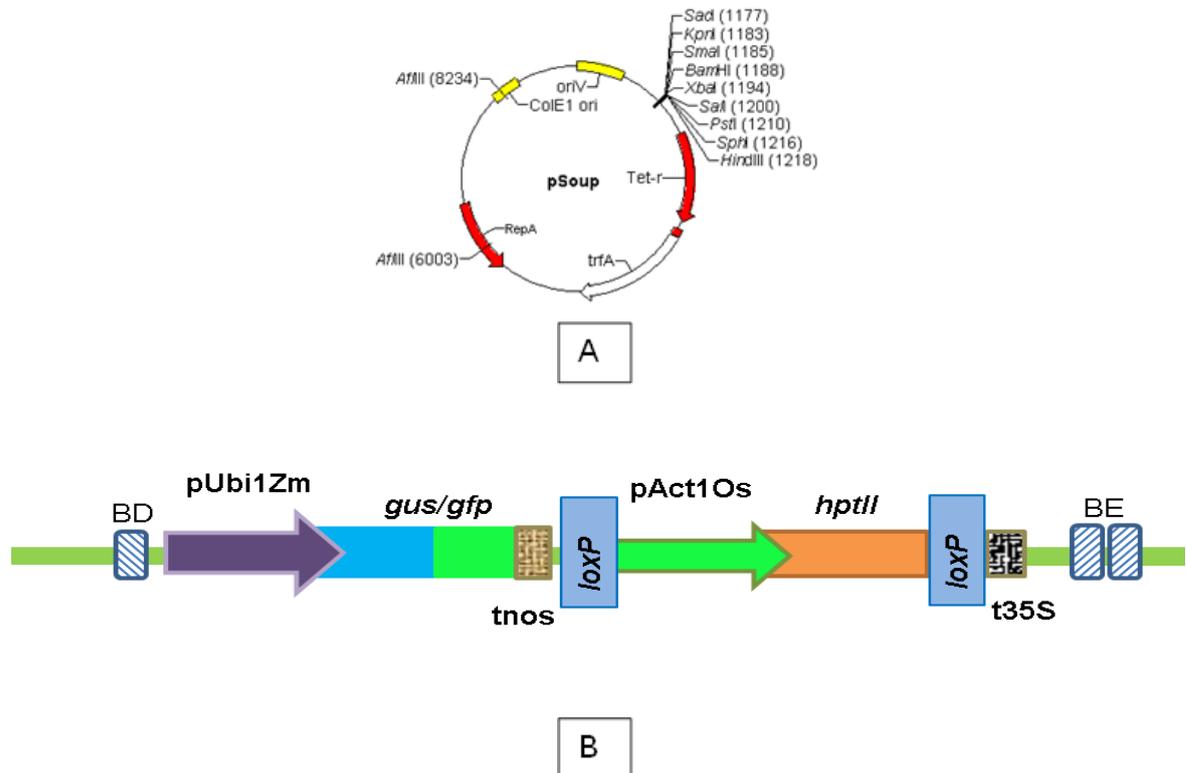


Figura 4.1 – Representação esquemática do sistema vetorial pSoup/pGPro1. (A) pSoup é o plasmídeo *helper* que contém o gene RepA. Este atua em trans sobre a origem de replicação (Ori pSA) do pGPro1. pSoup tem o gene de resistência a tetraciclina e duas origens de replicação colE1 e trfA. (B) pGPro1pUbi1 é o vetor binário, tem no T-DNA, após a borda direita (BD), o promotor do gene de ubi1 de milho (pUbi1Zm) dirigindo a expressão dos genes repórteres *gus/gfp* com o terminador do gene *nos*. Entre os sítios *loxP*, de reconhecimento da recombinase CRE, estão o promotor de act1 de arroz (pAct1Os), dirigindo a expressão do gene de resistência a higromicina (*hptII*), seguido do terminador do CaMV35S e duas bordas esquerdas (BE) *in tandem*. No esqueleto do vetor binário estão a colE1, origem de replicação para *Escherichia coli*, e a pSA, origem de replicação para *Agrobacterium*. A marca de seleção é o gene *nptII* que confere resistência a canamicina

No sistema vetorial pGPro/pSoup (THILMONY et al., 2006) a origem de replicação do pGPro1 para *Agrobacterium* (pSA) atua em *trans* no gene da replicase RepA presente no plasmídeo pSoup. Estes plasmídeos são compatíveis e corresidem no interior de células de *Agrobacterium* transformadas.

Cultivo da *Agrobacterium tumefaciens*

O preparo das células competentes e transformação por eletroporação das linhagens de *Agrobacterium* foi feito como descrito por Weigel e Glazebrook (2002). O sistema vetorial pGPro/pSoup foi introduzido nas linhagens de agrobactérias por

co-electroporação, usando os dois plasmídeos, ou por eletroporações independentes, usando um de cada vez.

As agrobactérias foram preparadas para co-cultura e agroinfiltração, espalhando-se 200 µL da linhagem recém-crescida, LBA4404pGPro1Ubi1 (Rf, Sm, Tc, Km) ou EHA105pGPro1Ubi1 (Rf, Tc, Km), em meio AB (Chilton et al., 1974) sólido suplementado com os antibióticos apropriados. As agrobactérias foram cultivadas por três a quatro dias a 28 °C, formando uma camada viscosa na superfície do meio.

Cultura de tecidos

Indução de unidades embriogênicas de arroz

Duzentas sementes foram inoculadas em um dos meios de indução NB ou NBBAP (meio NB suplementado com 0,2 mg/L de BAP) (Tabela 4.1), em placas de Petri que foram mantidas no escuro, a 25 ± 2 °C, por 4 semanas. Após este período, unidades embriogênicas (UE) foram identificadas com o auxílio de estereomicroscópio e transferidas para o respectivo meio de indução. Após oito a dez dias, as UE foram transferidas para meio de pré-regeneração e depois para os meios de regeneração MS3 ou NBreg.

Indução de suspensão celular embriogênica de *Brachiaria brizantha*

Calos obtidos em meios sólidos M1.3 pH 4 ou NBBAP pH 5,8 foram subcultivados para meios frescos, e após 15 dias, transferidos para os respectivos meios líquidos. Os calos foram mantidos em agitador orbital, a 100 rpm no escuro, durante quatro semanas para proliferação da suspensão celular (SC), com renovação dos meios a cada sete dias. Após este período, as SC foram separadas por sedimentação do material diferenciado e restos de calos, e o volume celular sedimentado (VCS) foi calculado. A partir daí, as SC foram multiplicadas por sucessivas repicagens, quando os agregados celulares eram separados por sedimentação em duas fases, a fase inferior continha os agregados grandes e a superior as pequenas, sendo o meio renovado a cada semana, até seu uso nas co-culturas.

Tabela 4.1 - Meios de cultura utilizados para indução e regeneração de unidades embriogênicas de *Oryza sativa* e suspensão celular de *Brachiaria brizantha*

Componentes	Meios de cultura Meio						
	M1.3	NB	MS3	MPR	NBreg	MR2	MMP1
Macronutrientes	MS	N6	MS	N6	N6	½N6	½MS
Micronutrientes	MS	B5	MS	B5	B5	B5	MS
Vitaminas	MS	B5	MS	B5	B5	B5	MS
ANA	--	--	0,5mg/L	1mg/L	0,5mg/L	0,5mg/L	0,2mg/L
2,4-D	3mg/L	2,5mg/L	--	--	--	--	--
BAP	0,2mg/L	--	1mg/L	5mg/L	3mg/L	1mg/L	--
Cinetina	--	--	2,5mg/L	--	--	2,5mg/L	0,5mg/L
ABA	--	--	--	2mg/L	--	--	--
Zeatina	--	--	--	--	--	--	--
GA ₃	--	--	--	--	--	--	0,2mg/L
Ácido Ascórbico	--	--	--	--	--	--	--
Inositol	--	100mg/L	--	100mg/L	100mg/L	100mg/L	--
Prolina	--	500mg/L	--	500mg/L	500mg/L	500mg/L	--
Glutamina	--	500mg/L	--	500mg/L	500mg/L	500mg/L	--
Caseína hidrol.	300mg/L	300mg/L	300mg/L	300mg/L	300mg/L	300mg/L	100mg/L
Sacarose	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%
Agar	1,4%	--	1,4%	--	--	--	--
Fitigel	--	0,3%	--	--	0,6%	0,6%	0,3%
Agarose tipo I	--	--	--	0,7%	--	--	--
pH	4	5,8	4	5,8	5,8	5,8	5,8

MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962); M1.3 e MS3 (CABRAL et al., 2011); Macro e micronutrientes N6 (CHU et al., 1975); NB, MPR e NBreg (SALLAUD et al., 2003)

Análises microscópicas

Unidades embriogênicas de arroz foram coletadas em diferentes fases de desenvolvimento e processadas para análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de luz (ML) como descrito no capítulo II.

Agroinfiltração

As agrobactérias cultivadas por três dias foram então recolhidas com uma espátula e suspensas em 15 mL de meio de agroinfiltração (Tabela 4.2) com Silwet L-77 (0; 0,005% ou 0,01%), sendo a suspensão homogeneizada em agitador tipo Vortex. A absorbância a 600 nm (A_{600}) foi ajustada para 0,5.

Sementes de braquiária e de arroz (30 a 40 por tratamento) foram inoculadas em placas de Petri contendo papel filtro e 5 mL de um dos meios líquidos, M1.3, NBBAP ou água, e incubadas no escuro por três ou sete dias. Após este período, foram secas em papel filtro por 5 min e transferidas para placa de Petri contendo 10 mL de suspensão de agrobactéria, submetidas, ou não, a sonicação e vácuo por 5

min. Testou-se também agitação por 5 min em vortex em presença ou ausência de carborundum a 0,1%, por 24 h ou quatro dias, a 25 °C. Após esses períodos, os explantes foram lavados em hipoclorito de sódio a 1%, enxaguados em água autoclavada e submetidos a teste histoquímico (JEFFERSON, 1987).

Tabela 4.2 – Meios de cultura usados para agroinfiltração, co-cultura e seleção de explantes de *Brachiaria brizantha* e *Oryza sativa*

Componentes	Co-cultura (R2CS)	Co-cultura líq (AAM)	Co-cultura sól (2N6AS)	Agroinfiltração	Meio seleção I (MSI)	Meio seleção II (MSII)
Macronutriente	R2	B5	N6	R2	R2	N6
Micronutrientes	R2	B5	N6	R2	R2	B5
Vitaminas	R2	MS	N6	R2	R2	B5
2,4-D	2,5mg/L	3mg/L	3	2,5mg/L	2,5mg/L	2,5mg/L
BAP	--	0,2mg/L	0,2mg/L	0,2mg/L	--	--
Inositol	--	--	--	--	--	100mg/
Prolina	--	--	--	--	--	500mg/
Glutamina	--	876mg/L	--	--	--	500mg/
Caseína hidrol.	--	500mg/L	--	--	--	300mg/
Ác. Aspártico	--	266mg/L	--	--	--	--
Arginina	--	174mg/L	--	--	--	--
Glicose	1%	3,6%	1%	10%	--	--
Sacarose	--	6,85%	3%	--	3%	3%
Acetoseríngona	100µM	100µM	100µM	100µM	--	--
Agarose tipo I	7g/L	--	--	--	7g/L	7g/L
Fitigel	--	--	0,3%	--	--	--
Cefotaxima	--	--	--	--	400mg/L	200mg/
Timentina	--	--	--	--	100mg/L	50mg/L
Higromicina	--	--	--	--	50mg/L	50mg/L
pH	5,5	5,2	5,2	5,2	6	6

R2CS, MSI e II (SALLAUD et al., 2003); AAM e 2N6AS (HIEI et al., 1994)

Co-cultura

As linhagens de agrobactérias cultivadas por três dias em meio sólido, foram suspendidas em 15 mL de meio de co-cultura líquida, R2CL (R2CS sem agarose) ou AAM (Tabela 4.2) e em seguida a suspensão bacteriana foi homogeneizada em agitador tipo Vortex. A A_{600} foi ajustada, com o meio de co-cultura, para 0,5.

Unidades embriogênicas de arroz ou SC de braquiária foram coletadas dos respectivos meios de indução sobre papel filtro autoclavado por 5 min, e transferidas para 15 mL da suspensão bacteriana em placa de Petri, ficando imersas por 30 min,

com agitação branda a cada 5 min. Os controles de regeneração e de transformação consistiram de explantes imersos nos meios de co-cultura sem a agrobactéria. Após a co-cultura líquida, os explantes foram transferidos para papel de filtro autoclavado até que não apresentassem nenhum resquício de umidade.

Para co-cultura sólida as UE de arroz foram inoculadas em meio R2CS ou AN6AS (Tabela 4.2) em placas de Petri, incubadas por três dias no escuro, a 25 °C. As SC de braquiária foram coletadas do papel filtro com espátula, e transferidas, parte para meio líquido de co-cultura R2CL ou AAM, e parte para meio sólido de co-cultura, R2CS ou AN6AS (Tabela 4.2) e incubadas por três dias a 20, 22 ou 25 °C. No caso de SC de braquiária, foram testadas diferentes concentrações de AS (acetoseringona), além do padrão descrito que é 100 µM, as concentrações de 0, 50, 200 e 400 µM, tanto na co-cultura líquida como na sólida, nos diferentes meios. Na co-cultura líquida testou-se o uso de agitação orbital ou não agitação. Outros fatores testados foram tempo de co-cultura (2, 3, 4 e 5 d), uso de sonicação (5 min), infiltração a vácuo (5 min), uso de antioxidantes como cisteína 40 mg/L, ácido ascórbico 20 mg/L e/ou nitrato de prata 5 mg/L.

6.3 Resultados e Discussão

Regeneração de Unidades embriogênicas de Oryza sativa

A regeneração de brotos a partir de UE da cv. Primavera foi baixa em todas as combinações de meio testadas, tendo variado de 15 a 20% (Tabela 4.3). Na combinação de meio NB/NBreg, usada rotineiramente para transformar arroz em vários laboratórios, a cv. Primavera regenerou 3 brotos albinos quando 285 UE foram avaliadas. Ao redor de 50% das UE produziram embriões somáticos (ES), no entanto não foi possível a obtenção de plântulas a partir destes. A indução de calos embriogênicos é bastante elevada, ao redor de 90% (dados não apresentados), indicando a fase de conversão de embriões para plântulas a limitação desse protocolo. Para melhor compreensão do desenvolvimento das UE, três fases foram analisadas. Na fase I as UE caracterizam-se por serem compactas, arredondadas com 1 a 2 mm de diâmetro (\emptyset), com superfície lisa (Figura 4.2 A), intensa proliferação de células meristemáticas e pró-embriões (Figura 4.2 B e C). UE na fase II apresentam-se menos compactas e com diferenciação de eixos embrionários

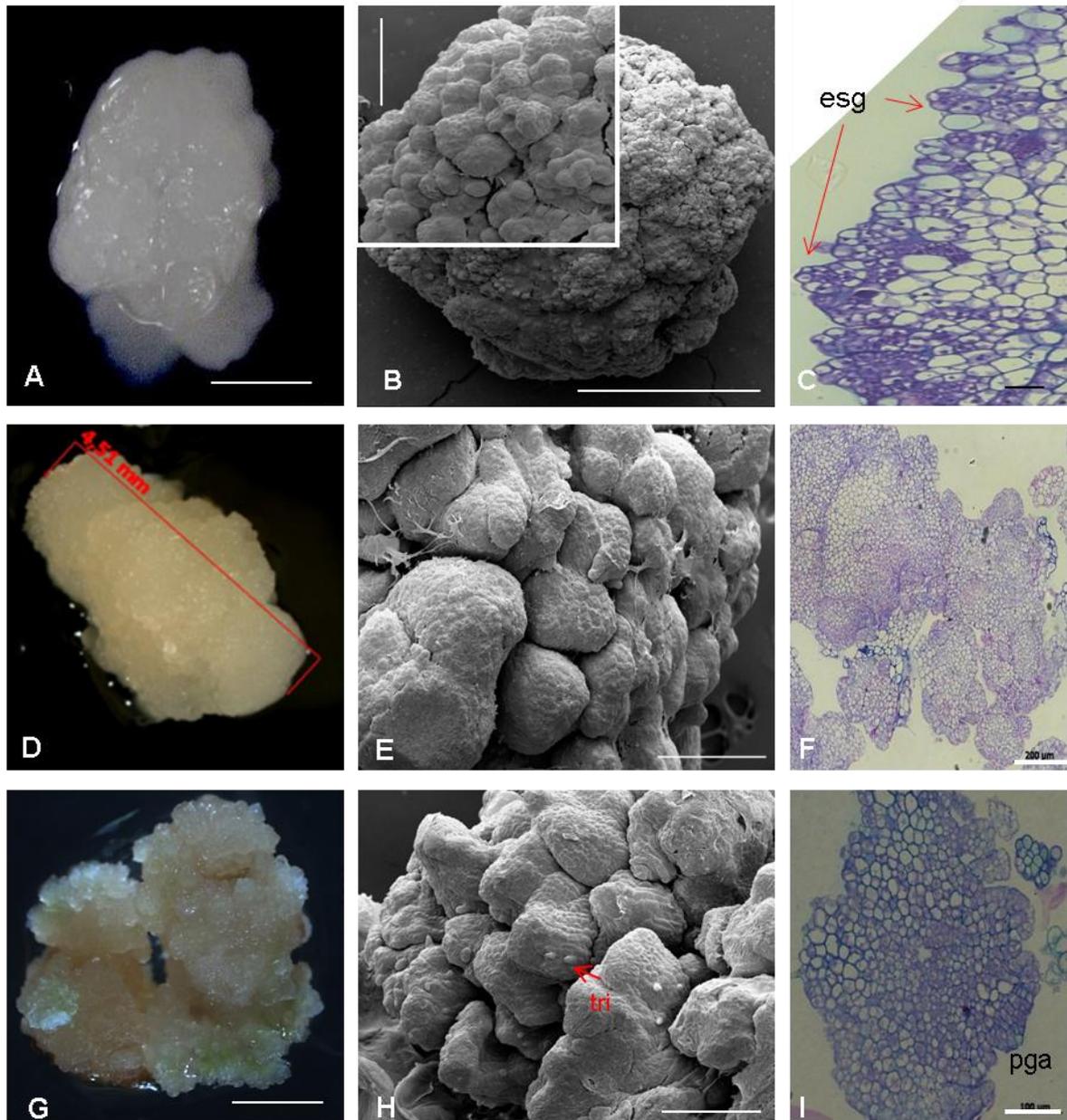


Figura 4.2 - Desenvolvimento de unidades embriogênicas (UE) de *Oryza sativa* cv. Primavera. (A) Fase I: UE arredondadas e superfície lisa; (B) com proliferação de células meristemáticas e pró-embriões, visíveis na eletromicrografia, e na micrografia de luz de corte histológico (C); na fase II as UE são menos compactas (D) e apresentam diferenciação de eixos embrionários e escutelo na eletromicrografia (E) e embriões em forma de torpedo formando outros embriões, num sistema repetitivo, mostrado na micrografia de luz (F); (G) na fase III, as UE com clorofila e (H) na eletromicrografia é visível a presença de estruturas do tipo escutelo-foliar com tricomas, e na (I) micrografia de luz a presença de embrião na forma torpedo, clava e gema adventícia. Barras: A = 500 μ m, B = 1 mm, C = 100 μ m, E, F e H = 200 μ m, G = 2 mm, I = 100 μ m. esg = embrião somático globular, pga = proliferação de gemas adventícias, * = proliferação de células meristemáticas.

(Figura 4.2 D a F). Na fase III, as UE apresentam regiões com coloração esverdeada, provavelmente com acúmulo de clorofila e várias estruturas do tipo escutelo-foliar (Figura 4.2 G a I). Apesar das UE na fase III apresentarem clorofila, muitas vezes não se observa a diferenciação de brotos.

O meio NB (meio N6) é muito eficiente para regeneração e transformação genética da cv. Nipponbare, Taipei 309, e várias outras cultivares do grupo Japônica (HIEI et al., 1994; SALLAUD et al., 2003). O meio básico de MS também foi testado para a cv. Primavera e como aqui apresentado, também resultou em baixa regeneração de brotos, entre 7 a 18% (BEVITÓRI, 2005). Apesar da cv. Primavera pertencer ao grupo Japônica, ela é classificada como Japônica tropical, que em termos de recalcitrância se assemelha às do grupo Indica, este engloba as cultivares mais recalcitrantes da espécie *O. sativa*.

O sistema de embriogênese somática da cv. Primavera via UE foi caracterizado, no entanto não demonstrou a eficiência esperada, sendo necessário o aperfeiçoamento da metodologia.

Tabela 4.3 – Resposta morfogênica de unidades embriogênicas (UE) de arroz a diferentes combinações de meios de indução e regeneração

Meios testados		Resposta morfogênica			
Indução	Regen.	Nº de UE que multiplicaram	Nº de UE com ES	Nº de UE com brotos (%)	Nº total de UE
NB	NBreg	78	204	3a	285
	MS3	93	357	78v+6a (15)	534
NBBAP	NBreg	24	78	21v+6a (16)	129
	MS3	9	93	27v+3a (20)	132

ES = embriões somáticos

Agroinfiltração

As plântulas de sementes de braquiária e arroz 3 d após germinação em papel filtro com água, e após 24 h ou 4 d de co-cultura com a linhagem LBA4404pGPro1pUbi1 apresentaram expressão do gene *gus*, com melhor resultado na cv. Marandu. Para ambas cultivares a co-cultura por 24 h e o uso de silwet menos concentrado (0,005%) apresentaram maior número de sementes com

expressão de GUS (GUS+). Nessas condições, a expressão do gene *gus* apresentou excelentes resultados, 80% em arroz e 100% em braquiária (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 - Expressão do gene *gus* em plântulas de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu e de *Oryza sativa* cv. Primavera germinadas por 3 d em papel filtro com água e após agroinfiltração por diferentes períodos com a linhagem LBA4404pGPro1pUbi1

Cultivar	Período de Agroinfiltração	Silwett L-77	número total sementes	GUS + (%)
<i>B. brizantha</i> Marandu	24 h	0,005%	30	12+++; 18++ (100)
		0,01%	30	10+ (33)
	4 d	0,005%	28	17+++; 9++ (93)
		0,01%	25	8+++; 4++; 6+ (72)
<i>O. sativa</i> Primavera	24 h	0,005%	30	24++ (80)
		0,01%	30	12+ (40)
	4 d	0,005%	42	6+++; 15++ (50)
		0,01%	39	14++ (36)

Expressão da GUS em área e intensidade crescente = +; ++; +++

Quando plântulas obtidas a partir de sementes germinadas em água foram cocultivadas por 4 d com EHA ou LBA contendo o pGPro1pUbi1, ambas cultivares apresentaram expressão da proteína GUS, e houve uma tendência desta ser maior sem a presença de silwet L-77. *B. brizantha* cv. Marandu apresentou maior porcentagem de sementes com expressão de GUS, não havendo diferença entre as linhagens testadas (Tabela 4.5).

Sementes de ambas cultivares induzidas por sete dias em meios com 2,4-D (M1.3 ou NBBAP), sonicadas e infiltradas com uma das linhagens de agrobactéria e cocultivadas por quatro dias em meio de agroinfiltração, na presença ou ausência do emoliente silwet L-77, apresentaram a mesma tendência dos experimentos anteriores. No entanto, de maneira geral, a expressão do gene *gus* ocorreu num número menor de sementes (Tabela 4.6).

Tabela 4.5 - Expressão do gene *gus* em plântulas três dias após germinação em água, de sementes de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu e *Oryza sativa* cv. Primavera, sonicadas e infiltradas com *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404pGpro1pUbi1 ou EHA105pGPro1pUbi1, e cocultivadas por quatro dias em meio de agroinfiltração, na presença ou ausência do emoliente silwet L-77

Cultivar	Linha-gem	Silwett L-77	nºtotal sementes	nº sementes GUS + (%)
<i>Brachiaria brizantha</i> Marandu	LBA	0,005%	34	17 ++ (50)
		0	37	27 ++ (73)
	EHA	0,005%	34	18 ++ (53)
		0	38	23 ++ (60)
<i>O. sativa</i> Primavera	LBA	0,005%	30	2 + (5)
		0	36	14 ++ (39)
	EHA	0,005%	28	5 + (18)
		0	30	6 + (20)

Expressão da GUS em área e intensidade crescente = +; ++; +++

Em todos os experimentos e condições testadas, a expressão do gene *gus* ocorreu, na maioria das vezes, na região do escutelo do embrião da semente (Figura 4.3 B, C, E, F), tendo ocorrido também de forma menos frequente, no coleóptilo de *B. brizantha* (Figura 4.3 E). Em arroz a expressão foi observada no escutelo (Figura 4.3 B) e algumas vezes na base do coleóptilo (Figura 4.3 C). O escutelo do embrião e base do coleóptilo e coleorriza (mesocótilo) apresentam células meristemáticas, que são as que formam os calos embriogênicos na cultura *in vitro* (mostrado no capítulo I), então, seria esperado que essas células fossem também as mais competentes para transformação genética na semente.

Resultados de expressão transiente da proteína GUS foram obtidos em folhas de *Panicum virgatum* (VANDERGHEYNST; GUO; SIMMONS, 2008; CHEN et al., 2010), e plântulas de *Panicum virgatum* e *Oryza sativa* cv. Nipponbare (LI et al., 2009), apenas quando a infiltração a vácuo e emolientes foram utilizados no processo de agroinfiltração.

A agroinfiltração foi um sistema eficiente, simples, de baixo custo e rápido para expressão transiente do gene repórter *gus* para ambas cultivares testadas neste trabalho. A funcionalidade do sistema vetorial pSoup/pGPro1 e da construção de pGPro1pUbi1 nas linhagens LBA4404 e EHA105 foi confirmada. *B. brizantha* cv. Marandu foi mais suscetível às duas linhagens de *Agrobacterium tumefaciens* do que *O. sativa* cv. Primavera. A utilização de plântulas 3 d após germinação em água,

com co-cultura por 24 h, sem uso de silwet L-77, foi a melhor condição para ambas as cultivares testadas.

Tabela 4.6 - Expressão do gene *gus* em sementes de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu e *Oryza sativa* cv. Primavera induzidas em diferentes meios, sonicadas e infiltradas com *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404pGpro1pUbi1 ou EHA105pGPro1pUbi1, e cocultivadas em meio de agroinfiltração, na presença ou ausência do emoliente silwet L-77

Cultivar	Linha-gem	Meio de indução	Silwett L-77 0,005%	nº total sementes	número sementes GUS + (%)
<i>B. brizantha</i> Marandu	LBA	NBBAP	COM	21	7 + (33)
			SEM	30	16 ++ (53)
	EHA	M1.3	COM	18	5 ++ (28)
			SEM	18	0
		NBBAP	COM	26	10 ++ (38)
			SEM	34	12 ++ (35)
M1.3	COM	20	0		
	SEM	25	0		
<i>O. sativa</i> Primavera	LBA	NBBAP	COM	30	6 + (20)
			SEM	30	6 + (20)
	EHA	M1.3	COM	34	1 + (3)
			SEM	31	1 + (3)

Expressão da GUS em área e intensidade crescente = +; ++; +++

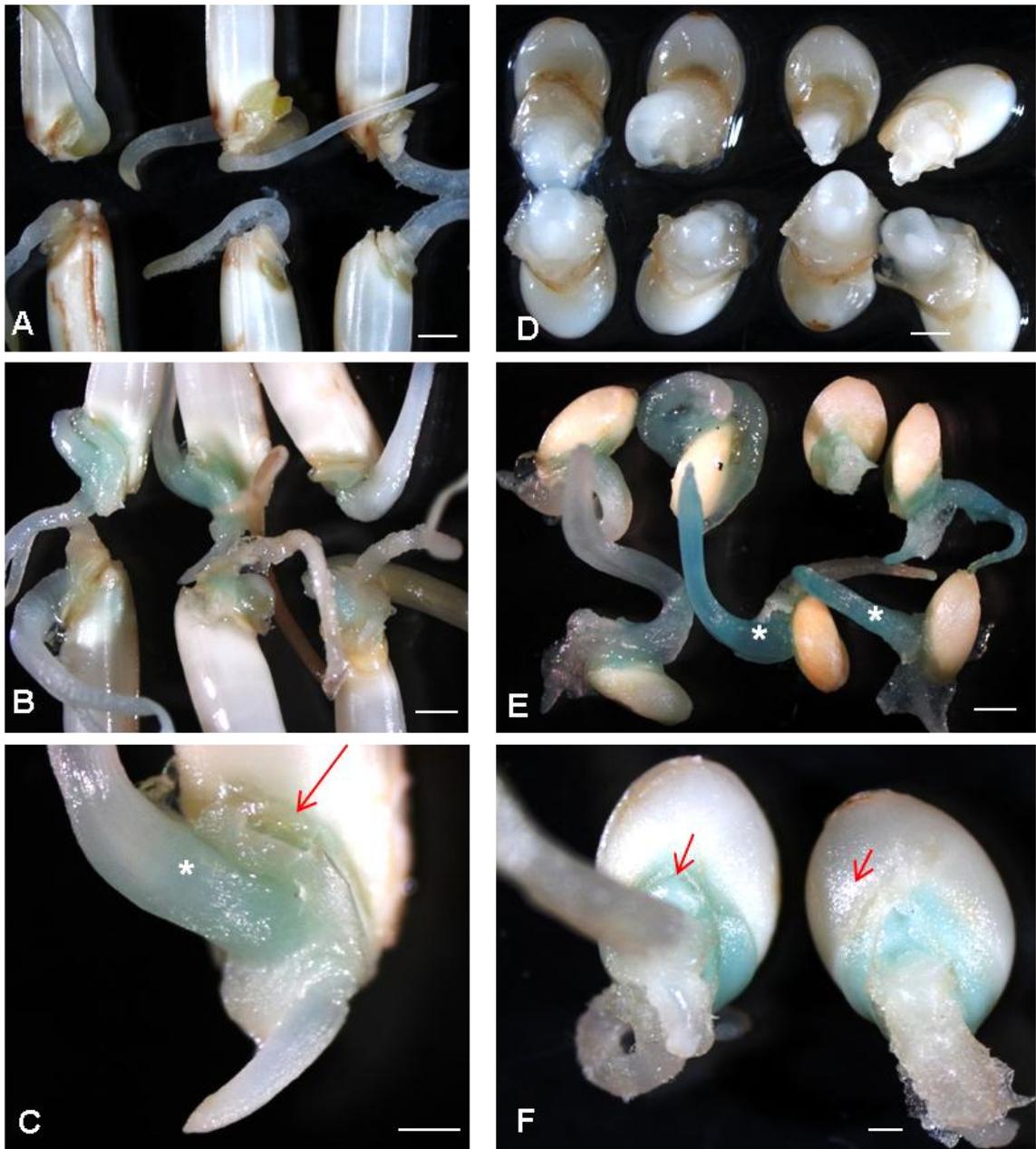


Figura 4.3 - Expressão do gene *gus* em sementes de *Oryza sativa* cv. Primavera e *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. Sementes controle de arroz (A) e de braquiária (D) cultivadas em meio sem agrobactéria; (B) sementes de arroz germinadas em água e agroinfiltradas por 4 d com a linhagem de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105pGPro1pUbi1, (C) escutelo (seta) e região meristemática na base do coleóptilo (asterisco) expressando GUS. (E) sementes de braquiária germinadas em água e agroinfiltradas por 4 d com a linhagem de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404pGpro1pUbi1, coleóptilos (asterisco) e (F) escutelos (seta) expressando GUS. Barras: A, B, D e E = 1mm, C e F = 500 μ m

Co-cultura de unidades embriogênicas de Oryza sativa com EHApGPro1pUbi1

Após co-cultura sólida de quatro dias em meio R2CL contendo 200 ou 400 μM de AS, com a linhagem EHA105pGPro1pUbi1, as UE passaram pela primeira etapa de seleção (meio MSI, Tabela 4.2), que foi de duas semanas na presença de 20 mg/L de higromicina. Após a primeira etapa, UE foram transferidas para meio MSII (higromicina, 50 mg/L) e uma semana depois, pequenas unidades globulares e esbranquiçadas eram visíveis em 10% a 44% das originais (Tabela 4.7 e Figura 4.4 A parte superior). O desenvolvimento dessas estruturas variou conforme o meio de indução de embriogênese e da concentração de AS usado, sendo que o meio NBBAP e AS a 400 μM apresentou o maior número de UE resistentes. O controle de transformação não apresentou UE resistentes à higromicina, com oxidação seguida de morte, e o controle de regeneração proliferou outras UE (Figura 4.4 A parte inferior). Como a cultivar Primavera não apresentou auto-fluorescência (Figura 4.4 B) no controle de regeneração, e o gene *gfp* está fusionado ao gene *gus* no pGPro1pUbi1 (Figura 4.1 B), este marcador repórter foi usado para arroz. Algumas UE resistentes à higromicina apresentaram expressão de GFP (Figura 4.4 C, D). As UE resistentes foram destacadas das originais e subcultivadas para meio fresco MSII (higromicina, 50 mg/L) para expô-las à seleção, sendo cultivadas por mais uma semana neste meio. Quando transferidas para meio de pré-regeneração (MPR) com higromicina, 80% das UE apresentaram início de formação de brotos albinos (Figura 4.4 E); quando transferidas sucessivas vezes (quatro) para meio de regeneração (NBreg) apresentaram aparência vitrificada. Apenas quando foram cultivadas em meio de regeneração MR2 com metade da concentração de macronutrientes formaram pontos verdes (Figura 4.4 F), e quando a higromicina foi removida do meio, brotos foram obtidos (Figura 4.4 G). Os brotos alongados em meio MMP1 com higromicina 20 mg/L não formaram raízes e morreram.

A agrobactéria EHA105 foi eficiente na transformação de células de UE da cultivar Primavera pela expressão da proteína marcadora GFP. Houve resposta diferencial quanto ao meio de indução de UE, indicando que a presença de BAP no meio de indução NB favoreceu a obtenção de UE resistentes. Em capim Bermuda BAP também apresentou efeito positivo na obtenção de calo embriogênico tipo II de monocotiledônea, que é o mais responsivo para formação de brotos (CHAUDHURY; QU, 2000).

Tabela 4.7 – Resposta de unidades embriogênicas de *Oryza sativa* cv. Primavera ao meio de indução de embriogênese e a concentração de acetoseringona (AS) usada no meio de co-cultura R2CL, após as duas etapas do processo de seleção e cultivo em MPR com 50 mg/L de higromicina

Meio indução/AS	média de UE ± DP	número* de UE resistentes ± DP	% UE resistentes
NB200	63 ± 22,5	6 ± 3	10
NB400	54 ± 17	15 ± 6	28
NBBAP200	42 ± 18	15 ± 4	36
NBBAP400	54 ± 12	24 ± 9	44

UE=unidades embriogênicas, DP=desvio padrão, AS=acetoseringona no meio de co-cultura R2CL. *Média de dois experimentos.

A co-cultura líquida e sólida nos meios R2CL e AAM sem a presença dos macronutrientes KH_2PO_4 , NH_4NO_3 , KNO_3 e CaCl_2 , foi testada, não tendo favorecido a expressão de *gus/gfp*, diferentemente do aumento da frequência de transformação obtido em *Lilium* (25,4%) na ausência desses sais (AZADI et al., 2010). A co-cultura sólida sob temperatura de 20 °C, por 3 d, testada para arroz não favoreceu a transformação genética. O crescimento da agrobactéria a 25 °C foi maior, formando um halo em torno das UE, sendo que este crescimento foi contido quando as UE foram transferidas para o primeiro meio de seleção (MSI) contendo cefotaxima e timentim. AS em elevada concentração (400 μM) aumentou o número de UE resistentes a higromicina. A cultivar Primavera demonstrou ser mais recalcitrante à regeneração do que à transformação, tanto quanto as cultivares do grupo Indica (TIE et al., 2012).

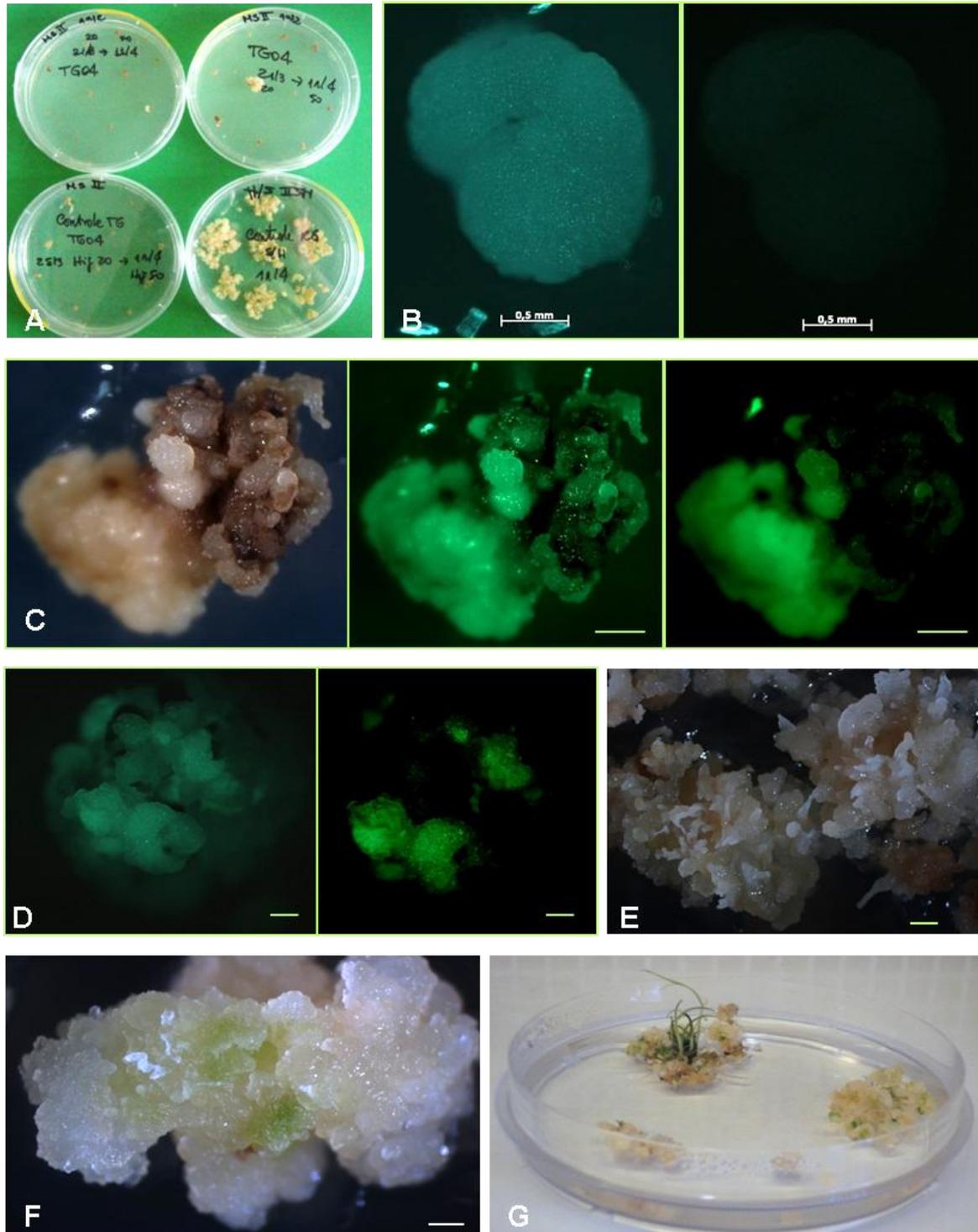


Figura 4.4 – Obtenção de unidades embriogênicas (UE) de *Oryza sativa* cv. Primavera resistente a higromicina após co-cultura com EHA105pGPro1pUbi1. (A) parte superior: UE obtidas em MSII 50 mg/L de higromicina, parte inferior: controle de transformação em higo 50 mg/L (esq.) e controle de regeneração, sem higo (dir.); (B) UE de controle de regeneração observada em luz branca (esq.) e em luz U.V. (dir.); (C) UE resistente a higo (50 mg/L) observada na luz branca (esq.), em luz branca + U.V. (centro) e em U.V. (dir.) com expressão da GFP; (D) UE resistente a higo (50 mg/L) observada na luz branca (esq.) e em U.V. (dir.) com expressão da GFP; (E) UE regenerando brotos albinos; (F) controle RG com UE em meio MR2 com pontos verdes (clorofila); (G) controle RG com brotos em MMP1

Co-cultura de SC de Brachiaria brizantha com as linhagens EHA105 ou LBA4404

Três a cinco dias após a co-cultura, as SC oriundas de meio NBBAP apresentavam-se turvas pelo crescimento de ambas linhagens de agrobactéria, diferentemente das SC oriundas do meio M1.3, que apresentavam-se límpidas. Talvez o pH 4 do meio M1.3 tenha desfavorecido o crescimento das agrobactérias nas co-culturas sólida e líquida. No entanto, o teste histoquímico após a co-cultura, revelou que apenas SC obtidas em meio M1.3, co-cultivadas em meio R2CL contendo 400 μ M de AS foram positivas para a expressão do gene *gus* com ambas linhagens testadas (Figura 4.5 C, D).

As SC foram cultivadas em meio DD1 (higromicina 10mg/L, Tm 100mg/L e Cx 200mg/L) após a co-cultura. Essas concentrações dos antibióticos timentina e cefotaxima foram suficiente para suprimir o crescimento da agrobactéria. O controle de regeneração, cultivado com timentina e cefotaxima, manteve a multiplicação das células sem ter havido efeito deletério visível. O controle de transformação, cultivado com higromicina além de timentina e cefotaxima, apresentou o mesmo VCS e oxidação das SC.

Após três subcultivos, as SC foram plaqueadas em meio de regeneração NBreg (Tm 50 mg/L, Cx 100 mg/L, higromicina 20 mg/L), onde algumas proliferaram unidades embriogênicas (UE) resistentes a higromicina (Figura 4.5 E a H). Essas UE apresentaram o desenvolvimento paralisado no estágio de proembrião e embrião globular (Figura 4.5 G, H), mesmo quando a higromicina foi suprimida do meio. O controle de regeneração originou brotos verdes normalmente, e 10 a 15% de albinos. O controle de transformação oxidou totalmente.

A adição de compostos fenólicos, como acetoseringona (AS), é uma das práticas mais utilizadas na transformação genética de plantas dicotiledôneas e monocotiledôneas via agrobactéria. Sua adição é indispensável para as plantas que não produzem um nível suficiente de moléculas-sinal para induzir os genes *vir*. Hiei et al. (1994) demonstraram que acetoseringona a 100 μ M foi o ponto chave para transformação bem sucedida de arroz. Suspensões celulares de *B. brizantha* só foram transformadas por agrobactéria quando AS foi usado em alta concentração (400 μ M). A associação entre AS e a condição de pH ácido do meio onde as SC foram induzidas, pode ter favorecido a ativação dos genes *vir* e transferência do T-DNA (VERNADE et al., 1988; POPELKA; ALTPETER, 2003). As duas linhagens de

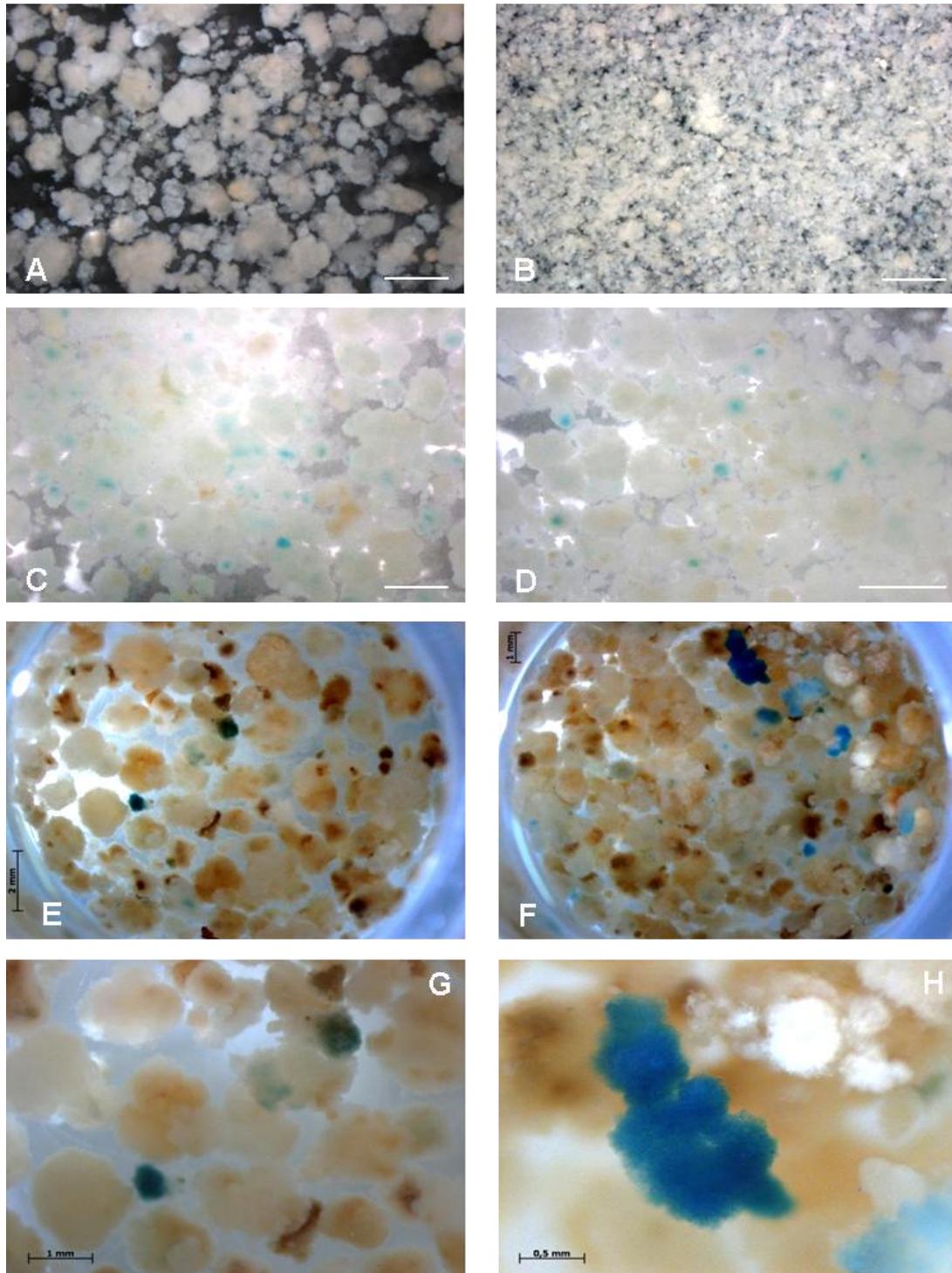


Figura 4.5 – Expressão transitente e estável do gene *gus* em suspensões celulares (SC) embriogênicas de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. (A) SC obtidas e cultivadas em M1.3 - controle de regeneração; (B) SC obtidas e cultivadas em NBBAP - controle de regeneração; (C) expressão transitente de *gus* em SC obtidas em M1.3 após co-cultura de 3 d com a LBA4404pGPro1pUbi1; (D) expressão transitente de *gus* em SC otidas em M1.3 após co-cultura de 3 d com a EHA105pGPro1pUbi1; (E) expressão estável de *gus* em SC obtidas em M1.3 cocultivadas com a LBA4404pGPro1pUbi1 e multiplicadas em higo (20 mg/L) por um mês, e em (G) aumento de E; (F) expressão estável de *gus* em SC obtidas em M1.3 cocultivadas com a EHA105pGPro1pUbi1 e multiplicadas em higo (20 mg/L) por um mês, e em (H) aumento de F. Barras: A, B, D, E = 2 mm; C, F, G = 1 mm; H = 0,5 mm

agrobactéria responderam à semelhança em termos de expressão transiente e estável do genogus. Uma vez que em dosagens menores de AS (0 a 200 μ M) não foi obtida transformação de SC de *B. brizantha*, pode ser que uma dosagem elevada seja necessária para suprimir a ação de compostos inibidores de genes *vir* para que haja a ativação, e conseqüente transformação nesta espécie. Em várias monocotiledôneas estão presentes indutores e inibidores dos genes *vir*, tornando importante remover ou suprimir os efeitos dos inibidores, pela utilização de compostos indutores adequados e potentes como o AS (SOOD; BHATTACHARYA; SOOD, 2011).

Hiei et al. (1994, 1997) afirmaram que um dos fatores mais importantes para transformação eficiente de plantas é a utilização de calos embriogênicos ou células com elevada capacidade de divisão celular. As SC de *B. brizantha* estavam na fase exponencial de crescimento, o que pode ter favorecido a suscetibilidade das células à infecção por *Agrobacterium*. Aliado ao acréscimo de AS e à alta taxa de divisão celular das SC, fatores do meio de co-cultura R2CL como a redução de cálcio, a presença de monossacarídeo não metabolizável (D-glicose) e a redução de fonte de nitrogênio mineral, foram unidos para de um lado aumentar a suscetibilidade das células de *B. brizantha*, e do outro, aumentar a ativação dos genes *vir* da agrobactéria (HIEI; KOMARI; KUBO, 1997; YANG et al., 2004; KARAMI et al., 2009; SALLAUD et al., 2003; SOOD; BHATTACHARYA; SOOD, 2011). Ainda segundo Hiei et al. (1997), a co-cultura sólida é melhor do que a co-cultura em meio líquido. Para *B. brizantha* a co-cultura líquida funcionou melhor do que a sólida, talvez porque as SC que passaram pela co-cultura sólida apresentaram-se muito mais oxidadas.

A temperatura entre 22 e 25 °C durante a co-cultura tem sido apontada como um fator importante para favorecer a transformação genética. De todas as temperaturas testadas para *B. brizantha*, a temperatura de 20 °C foi a única efetiva. Talvez a temperatura mais baixa favoreça a ativação da agrobactéria (POPELKA; ALTPETER, 2003; YANG et al. 2004) e desfavoreça os microrganismos endofíticos presentes, vulnerabilizando as células de braquiária.

Até recentemente, SC eram relatadas como explantes de baixa frequência de transformação, uma vez que eventos de transformação ocorriam apenas em grandes aglomerados celulares (OZAWA; TAKAIWA, 2010). Em SC de *B. brizantha* apenas aquelas obtidas em meio M1.3, que apresentam aglomerados celulares

maiores do que as obtidas em meio NBBAP (Figura 4.5 A, B) foram transformadas por EHA e LBA (Figura 4.5 C a H). Aliado aos fatores já mencionados acima de AS e pH 4, talvez no caso de braquiária os aglomerados maiores sejam mais competentes para transformação.

Segundo Vogel e Hill (2008), atualmente a maior limitação da transformação é a incapacidade da maioria das linhagens transgênicas de calos regenerarem plantas. Inicialmente eles observaram um decréscimo na fertilidade das plantas regeneradas, de acordo com o número de subcultivos aos quais os calos eram submetidos. Para minimizar este problema eles transferiam os calos de *Brachipodium distachyum* resistentes a higromicina assim que eles eram visíveis, o mais rapidamente possível, para meio de regeneração contendo antibiótico. Mesmo usando esta estratégia eles obtiveram regeneração em menos da metade das linhagens de calos resistentes. Outro fator apontado por Vogel e Hill (2008) que afeta diretamente a eficiência de transformação é o promotor usado para dirigir a expressão do gene de seleção. Eles identificaram que em *Brachypodium* o promotor pAct1Os, mesmo contendo um intron 5' (pGPro2), foi menos eficiente do que o p35SCaMV. Talvez o pAct1Os não seja um promotor tão eficiente também no caso de *B. brizantha*. Recentemente, Mann et al. (2012) desenvolveram vários vetores binários e derivativos de pUC compatíveis com o sistema gateway, com diversos promotores de poliubiquitina de *Panicum virgatum*, ou vetores pANIC, que podem ser uma excelente opção para *Brachiaria*.

A redução do período de exposição das SC de *B. brizantha* ao 2,4-D antes da co-cultura (DUTT; GROSSER, 2009; OZAWA; TAKAIWA, 2010), assim como a redução do período e número de subcultivos durante a seleção de células transformadas após a co-cultura com *Agrobacterium* (YANG et al., 2004) serão pontos chave para superar a inabilidade de regenerar plântulas a partir das UE transformadas.

Neste trabalho foi demonstrado pela primeira vez que *B. brizantha* é suscetível a *Agrobacterium tumefaciens*, podendo ser transformada pelas cepas EHA105 e LBA4404. Trabalhos no sentido de regenerar as UE transformadas estão sendo conduzidos.

6.4. Conclusões

- ✓ A cultivar Primavera é recalcitrante à cultura de tecidos. O sistema de embriogênese somática via UE foi caracterizado, e demonstrou ser ineficiente, sendo necessário o aperfeiçoamento da metodologia.
- ✓ A linhagem EHA105 é capaz de transformar células de unidades embriogênicas da cultivar Primavera de *Oryza sativa* e a expressão da proteína marcadora GFP foi detectada.
- ✓ Foi obtido um sistema de agroinfiltração eficiente, simples, de baixo custo e rápido para expressão transiente de genes repórteres nas cultivares Primavera de arroz e Marandu de *B. brizantha*.
- ✓ *B. brizantha* cv. Marandu foi mais suscetível às duas linhagens de *Agrobacterium tumefaciens* do que *O. sativa* cv. Primavera.
- ✓ Suspensões celulares de *B. brizantha* são suscetíveis a transformação genética por *Agrobacterium tumefaciens*, e foram transformadas pelas cepas EHA105 e LBA4404, nas condições mostradas neste trabalho.

7. Conclusões Gerais

- ✓ A caracterização morfológica detalhada da embriogênese somática em *B. brizantha* a partir de sementes maduras foi demonstrada.
- ✓ Foi obtido um sistema eficiente para micropropagação a longo prazo de *Brachiaria*.
- ✓ Um sistema alternativo para embriogênese somática de sementes foi obtido usando segmentos basais de plantas cultivadas *in vitro*.
- ✓ Foi estabelecida uma metodologia para obtenção, multiplicação e regeneração de suspensões celulares de *B. brizantha*.
- ✓ Foi obtido um sistema de expressão transiente de genes para testar vetores e construções para gramíneas via biobalística usando sementes maduras.
- ✓ Calos embriogênicos bombardeados originaram plântulas resistentes a higromicina, tendo sido confirmada a presença do gene *hptII* por PCR, sem a presença do gene *gus*.
- ✓ Um sistema de transformação genética de suspensões celulares de *B. brizantha* por biobalística foi obtido.

- ✓ Foi estabelecido um sistema de agroinfiltração eficiente, simples, de baixo custo e rápido para expressão transiente de genes para as cultivares Primavera de *Oryza sativa* e Marandu de *B. brizantha*.

- ✓ Suspensões celulares de *B. brizantha* são suscetíveis à transformação genética por *Agrobacterium tumefaciens*, e foram transformadas pelas cepas EHA105 e LBA4404, pela primeira vez. Unidades embriogênicas resistentes a higromicina e expressando estavelmente o gene *gus* foram obtidas.

- ✓ A higromicina parece estar impedindo o desenvolvimento de proembriões resistentes ao antibiótico.

- ✓ A cultivar Primavera de *Oryza sativa* é recalcitrante à cultura de tecidos. O sistema de embriogênese somática via unidades embriogênicas foi caracterizado, e demonstrou ser ineficiente na regeneração, sendo necessário o aperfeiçoamento da metodologia.

- ✓ A linhagem EHA105 é capaz de transformar células de unidades embriogênicas da cultivar Primavera de *Oryza sativa* e a expressão da proteína marcadora GFP foi detectada.

REFERÊNCIAS

AHMADABADI, M.; RUF, S.; BOCK, R. A leaf-based regeneration and transformation system for maize (*Zea mays* L.). **Transgenic Research**, Heidelberg, v. 16, n. 4, p. 437-448, 2007.

AHMED, N.; MAEKAWA, M.; NODA, K. Anthocyanin accumulation and expression pattern of anthocyanin biosynthesis genes in developing wheat coleoptiles. **Biologia Plantarum**, Praga, v. 53, p. 223-228, 2009.

ALBERTINI, E.; MARCONI, G.; REALE, L.; BARCACCIA, G.; PORCEDDU, A.; FERRANTI, F.; FALCINELLI, M. *SERK* and *APOSTART*: Candidate genes for apomixis in *Poa pratensis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 138, p. 2185-2199, 2005.

ALTPETER, F.; JAMES, V. A. Genetic transformation of turf-type Bahiagrass (*Paspalum notatum* Flugge) by biolistic gene transfer. **International Turfgrass Society Research Journal**, New Brunswick, v. 10, p. 485-489, 2005.

ALTPETER, F.; BAISAKH, N.; BEACHY, R.; BOCK, R.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P.; DANIELL, H.; DATTA, K.; DATTA, S.; DIX, P. J.; FAUQUET, C.; HUANG, N.; KOHLI, A.; MOOIBROEK, H.; NICHOLSON, L.; NGUYEN, T. T.; NUGENT, G.; RAEMAKERS, K.; ROMANO, A.; SOMERS, D. A.; STOGER, E.; TAYLOR, N.; VISSER, R. Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. **Molecular Breeding**, Heidelberg, v. 15, p. 305-327, 2005.

ALVES, E. R.; CARNEIRO, V. T. C.; ARAÚJO, A. C. Direct evidence of pseudogamy in an apomictic *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Sexual Plant Reproduction**, Berlin, v. 14, p. 207-212, 2001.

ARAGÃO, F. J. L.; VIANNA, G. R.; ALBINO, M. M. C.; RECH, E. L. Transgenic dry bean tolerant to the herbicide glufosinate ammonium. **Crop Science**, Madison, v. 42, p. 1298-1302, 2002.

ARAGÃO, F. J. L.; BARROS, L. M. G.; BRASILEIRO, A. C. M.; RIBEIRO, S. G.; SMITH, F. D.; SANFORD, J. C.; FARIA, J. C.; RECH, E. L. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 93, p.142-150, 1996.

ARAÚJO, A. C. G.; FALCÃO, R.; CARNEIRO, V. T. C. Seed abortion in the sexual counterpart of *Brachiaria brizantha* apomicts (Poaceae). **Sexual Plant Reproduction**, Berlin, v. 20, p. 109-121, 2007.

ARAÚJO, A. C. G.; MUKHAMBETZHANOV, S.; POZZOBON, M. T.; SANTANA, E. F.; CARNEIRO, V. T. C. Female gametophyte development in apomictic and sexual *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Revue de Cytologie et de Biologie Vegetales - Le Botaniste**, Paris, v. XIII, p. 13-28, 2000.

ARAÚJO, S. A. C.; DEMINICIS, B. B.; CAMPOS, P. R. S. S. Melhoramento genético de plantas forrageiras tropicais no Brasil. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 57, n. R, p. 61-76, 2008.

ARTUNDUAGA, I. R.; TALIAFERRO, C. M.; JOHNSON, B. L. Effects of auxin concentration on induction and growth of embryogenic callus from young inflorescence explants of Old World bluestem (*Bothriochloa* spp.) and bermuda (*Cynodon* spp.) grasses. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 12, p. 13-19, 1988.

ASKER, S. E.; JERLING, L. **Apomixis in Plants**. Boca-Raton: CRC Press, 1992. 298p.

AZADI, P.; CHIN, D. P.; KURODA, K.; KHAN, R. S.; MII, M. Macro elements in inoculation and co-cultivation medium strongly affect the efficiency of Agrobacterium-mediated transformation in *Lilium*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 101, n. 2, p. 201-209, 2010.

BARTLETT, J. G.; SNAPE, J. W.; HARWOOD, W. A. Intron-mediated enhancement as a method for increasing transgene expression levels in barley. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 7, p. 856-866, 2009.

BEVITÓRI, R. Meios de cultivo in vitro e transformação genética de arroz (*Oryza sativa*) mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 18, 2005. 23 p.

BOURGIN, J. P.; CHUPEAU, Y.; MISSIONIER, C. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of several *Nicotiana* species. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 45, p. 188-292, 1979.

BREGITZER, P.; CAMPBELL, R. D. Genetic Markers Associated with Green and Albino Plant Regeneration from Embryogenic Barley Callus. **Crop Science**, Madison, v. 41, p. 173-179, 2001.

BROOHAERTS, W.; MITCHELL, H. J.; WEIR, B.; KAINES, S.; SMITH, L. M. A.; YANG, W.; MAYER, J. E.; ROA-RODRÍGUEZ, C.; JEFFERSON, R. A. Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. **Nature**, London, v. 433, p. 629-633, 2005.

BURRIS, J. N.; MANN, D. G. J.; JOYCE, B. L.; STEWART, C. N. An Improved Tissue Culture System for Embryogenic Callus Production and Plant Regeneration in Switchgrass (*Panicum virgatum* L.). **BioEnergy Research**, New York, v. 2, n. 4, p. 267-274, 2009.

CABRAL, G. B.; CARNEIRO, V. T. C.; LACERDA, A. L.; VALLE, C. B.; MARTINELLI, A. P.; DUSI, D. M. A. Somatic embryogenesis and organogenesis in apomictic and sexual *Brachiaria brizantha*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 107, n. 2, p. 271-282, 2011.

CARRER, H.; HOCKENBERRY, T. N.; SVAB, V.; MALIGA, P. Kanamycin resistance as a selectable marker for plastid transformation in tobacco. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 241, p. 49-56, 1993.

CASSELS, A. C.; CURRY, R. F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 64, p. 145-157, 2001.

CHAUDHURY, A.; QU, R. Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf-type bermudagrass: Effect of 6-benzyladenine in callus induction medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 60, p. 113-120, 2000.

CHEN, X.; EQUI, R.; BAXTER, H.; BERK, K.; HAN, J.; AGARWAL, S.; ZALE, J. A high-throughput transient gene expression system for switchgrass (*Panicum virgatum* L.) seedlings. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 3, n. 9, 2010.

CHIANCONE, B.; TASSONI, A.; BAGNI, N.; GERMANÀ, M.A. Effect of polyamines on *in vitro* anther culture of Citrus clementina Hort. Ex Tan. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 87, p. 145-153, 2006.

CHIAPPETTA, A.; FAMBRINI, M.; PETRARULO, M.; RAPPARINI, F.; MICHELOTTI, V.; BRUNO, L.; GRECO, M.; BARALDI, R.; SALVINI, M.; PUGLIESI, C.; BITONTI, M. B. Ectopic expression of LEAFY COTYLEDON1-LIKE gene and localized auxin accumulation mark embryogenic competence in epiphyllous plants of *Helianthus annuus* X *H. tuberosus*. **Annals of Botany**, Oxford, v. 103, p. 735-747, 2009.

CHILTON, M. D.; CURRIER, T. C.; FARRAND, S. K.; BENDICH, A. J.; GORDON, M. P.; NESTER, E. W. *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumours. **Proceedings of National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 71, p. 3672-3676, 1974.

CHIU, W. L.; NIWA, Y.; ZENG, W.; HIRANO, T.; KOBAYASHI, H.; SHEEN, J. Engineered GFP as a vital reporter in plants. **Current Biology**, London, v. 6, p. 325-330

CHO, M. J.; JIANG, W.; LEMAUX, P.G. Transformation of recalcitrant barley cultivars through improvement of regenerability and decreased albinism. **Plant Science**, Amsterdam, v. 138, p. 229-244, 1998.

CHOI, W.; LEMAUX, P. G.; CHO, M-J. Increased chromosomal variation in transgenic versus non-transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) plants. **Crop Science**, Madison, v. 40, p. 524-533, 2000.

CHOI, Y. E.; SOH, W. Y. Effect of plumule and radicle on somatic embryogenesis in the cultures of ginseng zygotic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 45, p. 137-143, 1996.

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**, Heidelberg, v. 5, n. 3, p. 213-218, 1996.

CHRISTOU, P.; FORD, T. L.; KOFRON, M. Genotype-independent stable transformation of rice (*Oryza sativa*) plants. **Bio/Technology**, New York, v. 9, p. 957-962, 1991.

CHU, C. C.; WANG, C. C.; SUN, C. S.; HSU, C.; YIN, K. C.; CHU, C. Y.; BI, F. Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. **Scientia Sinica**, Peking, v. 18, p. 659-668, 1975.

CONSTANTIN, M. J. Chromosome Instability in Cell and Tissue Cultures and Regenerated Plants. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 21, p. 359-368, 1981.

DAI, W.; SU, Y.; CASTILLO, C.; BESLOT, O. Plant regeneration from in vitro leaf tissues of *Viburnum dentatum* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 104, p. 257-262, 2011.

DALL'AGNOL, M.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Apomixia, Genética e Melhoramento de Plantas - Apomixis. **Revista Brasileira de Agrobiociências**, Pelotas, v. 11, n. 2, p. 127-133, 2005.

DALTON, S. J.; BETTANY, A. J. E.; BHAT, V.; GUPTA, M. G.; BAILEY, K.; TIMMS, E.; MORRIS, P. Genetic transformation of *Dichanthium annulatum* (Forssk) - an apomictic tropical forage grass. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 21, p. 974-980, 2003.

DAN, Y. Biological functions of antioxidants in plant transformation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Wallingford, v. 44, n. 3, p. 149-161, 2008.

DE BLOCK, M.; BOTTERMAN, J.; VANDEWIELE, M.; DOCKX, J.; THOEN, C.; GOSSELE, V.; MOVVA, N. R.; THOMPSON, C.; VAN MONTAGU, M.; LEEMANS, J. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 6, p. 2513-2518, 1987.

DEO, P. C.; HARDING, R. M.; TAYLOR, M.; TYAGI, A. P.; BECKER, D. K. Somatic embryogenesis, organogenesis and plant regeneration in taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 99, p. 61-71, 2009.

DEO, P. C.; TAYLOR, M.; HARDING, R. M.; TYAGI, A. P.; BECKER, D. K. Initiation of embryogenic cell suspensions of taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) and plant regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 100, p. 283-291, 2010.

DONGYI, H.; KELEMU, S. *Acremonium implicatum*, a seed-transmitted endophytic fungus in *Brachiaria* grasses. **Plant Disease**, St. Paul, v. 88, n. 11, p. 1252-1254, 2004.

DUSI, D. M. A. **Apomixis in *Brachiaria decumbens* Stapf.** (PhD thesis). University of Wageningen, Wageningen, 2001. 167 p.

DUSI, D. M. A.; WILLEMSE, M. T. M. Apomixis in *Brachiaria decumbens* Stapf.: gametophytic development and reproductive calendar. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, Krakow, v. 41, p. 151-162, 1999.

DUTT, M.; GROSSER, J. Evaluation of parameters affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 98, n. 3, p. 331-340, 2009.

ESPOSITO-POLESI, N. P. Microrganismos endofíticos e a cultura de tecidos vegetais: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 9, n. 4, p. 533-541, 2011.

EUCLIDES, V. P. B.; MACEDO, M. C. M.; VALLE, C. B. Produção de forragem e características da estrutura do dossel de cultivares de *Brachiaria brizantha* sob pastejo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, p. 1805-1812, 2008.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 74, p. 201-228, 2003.

FELISMINO, M. F.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B.; RESENDE, R. M. S. Meiotic stability in two valuable interspecific hybrids of *Brachiaria* (Poaceae). **Plant Breeding**, New York, v. 131, n. 3, p. 402-408, 2012.

FINER, J. J.; McMULLEN, M. D. Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Wallingford, v. 27, p. 175-182, 1991.

FISCHER, C.; SPETH, V.; FLEIG-EBERENZ, S.; NEUHAUS, G. Induction of zygotic polyembryos in wheat: Influence of Auxin Polar Transport. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 9, p. 1767-1780, 1997.

FONSECA, J. R.; CASTRO, E. M.; MORAIS, O. P.; SOARES, A. A.; PEREIRA, J. A.; LOBO, V. L. S.; RESENDE, J. M. Descrição Morfológica, Agronômica, Fenológica e Culinária de Alguns Tipos Especiais de Arroz (*Oryza sativa* L.). Santo Antônio de Goiás, GO: Embrapa Arroz e Feijão, **Documento** 210, 28 p. 2007.

GAMBINO, G.; MINUTO, M.; BOCCACCI, P.; PERRONE, I.; VALLANIA, R.; GRIBAUDO, I. Characterization of expression dynamics of WOX homeodomain transcription factors during somatic embryogenesis in *Vitis vinifera*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 3, p. 1089-1101, 2011.

GERMANÀ, M. A. Anther culture for haploid and doubled haploid production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 104, n. 3, p. 283-300, 2011.

GHOSH, A.; GANAPATHI, T. R.; PRAVENDRA, N.; BAPAT, V. A. Establishment of embryogenic cell suspension cultures and *Agrobacterium*-mediated transformation in an important Cavendish banana cv. Robusta (AAA). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 97, p. 131-139, 2009.

GONDO, T.; MATSUMOTO, J.; TSURUTA, S-I; YOSHIDA, M.; KAWAKAMI, A.; TERAMI, F.; EBINA, M.; YAMADA, T.; AKASHI, R. Particle inflow gun-mediated transformation of

multiple-shoot clumps in rhodes grass (*Chloris gayana*). **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 166, p. 435-441, 2009.

GONDO, T.; TSURUTA, S-I.; AKASHI, R.; KAWAMURA, O.; HOFFMANN, F. Green, herbicide-resistant plants by particle inflow gun-mediated gene transfer to diploid bahiagrass (*Paspalum notatum*). **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 162, n. 12, p. 1367-1375, 2005.

GORDON, S. P.; CHICKARMANE, V. S.; OHNO, C.; MEYEROWITZ, E. M. Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the *Arabidopsis* shoot meristem. **Proceedings of National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 106, n. 38, p. 16529-16534, 2009.

GORDON, S. P.; HEISLER, M. G.; REDDY, G. V.; OHNO, C.; DAS, P.; MEYEROWITZ, E. M. Pattern formation during de novo assembly of the *Arabidopsis* shoot meristem. **Development**, Cambridge, v. 134, p. 3539-3548, 2007.

GOUT, E.; BOISSON, A-M.; AUBERT, S.; DOUCE, R.; BLIGNY, R. Origin of the cytoplasmic pH changes during anaerobic stress in higher plant cells, Carbon-13 and Phosphorous-31 Nuclear Magnetic Resonance studies. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, p. 912-925, 2001.

GUERN, J.; MATHIEU, Y.; PEAN, M.; PASQUIER, C.; BELOEIL, J-C.; LALLEMAND, J-Y. Cytoplasmic pH regulation in *Acer pseudoplatanus* cells. **Plant Physiology**, Rockville, v. 82, p. 840-845, 1986.

HARWOOD, W. A. Advances and remaining challenges in the transformation of barley and wheat. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 5, p. 1791-1798, 2012.

HECHT, V.; VIELLE-CALZADA, J. P.; HARTOG, M. V. The *Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, p. 803-816, 2001.

HELLENS, R. P.; EDWARDS, E. A.; LEYLAND, N. R.; BEAN, S.; MULLINEAUX, P. M. pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium* mediated plant transformation. **Plant Molecular Biology**, Heidelberg, v. 42, p. 819-832, 2000.

HIEI, Y.; KOMARI, T.; KUBO, T. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Molecular Biology**, Heidelberg, v. 35, n. 1, p. 205-218, 1997.

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. **Plant Journal**, Oxford, v. 6, n. 2, p. 271-282, 1994.

HIROCHIKA, H.; SUGIMOTO, K.; OTSUKI, Y.; TSUGAWA, H.; KANDA, M. Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. **Proceedings of National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 93, p. 7783-7788, 1996.

HOEKEMA, A.; HIRSCH, P. R.; HOOYKAAS, P. J. J.; SCHILPEROORT, R. A. Binary vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. **Nature**, London, v. 303, p. 179-180, 1983.

HOOD, E. E.; GELVIN, S. B.; MELCHERS, S.; HOEKEMA, A. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants EHA105. **Transgenic Research**, Heidelberg, v. 2, p. 208-218, 1993.

HOOD, E. E.; HELMER, G. L.; FRALEY, R. T.; CHILTON, M. D. The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. **Journal of Bacteriology**, Washington DC, v. 168, p. 1291-1301, 1986.

ISHIGAKI, G.; GONDO, T.; SUENAGA, K.; AKASHI, R. Fertile transgenic *Brachiaria ruziziensis* (ruzigrass) plants by particle bombardment of tetraploidized callus. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 169, n. 5, p. 546-549, 2012.

ISHIGAKI, G.; GONDO, T.; SUENAGA, K.; AKASHI, R. Multiple shoot formation, somatic embryogenesis and plant regeneration from seed-derived shoot apical meristems in ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*). **Grassland Science**, Tokyo, v. 55, n. 3, p. 46-51, 2009a.

ISHIGAKI, G.; GONDO, T.; SUENAGA, K.; AKASHI, R. Induction of tetraploid ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*) plants by colchicine treatment of *in vitro* multiple-shoot clumps and seedlings. **Grassland Science**, Tokyo, v. 55, n. 3, p. 164-170, 2009b.

JEFFERSON, R. A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 5, p. 387-405, 1987.

JEONG, Y-M.; JUNG, E-J.; HWANG, H-J; KIM, H.; LEE, S-Y.; KIM, S-G. Roles of the first intron on the expression of *Arabidopsis thaliana* genes for actin and actin-binding proteins. **Plant Science**, Amsterdam, v. 176, p. 58-65, 2009.

JUNG, K-H; GYNHEUNG, A.; RONALD, P. Towards a better bowl of rice: assigning function to tens of thousands of rice genes. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 9, p. 91-101, 2008.

KARAMI, O.; ESNA-ASHARI, M.; KURDISTANI, G. K.; AGHAVAISI, B. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: the role of host. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 53, n. 2, p. 201-212, 2009.

KARP, A. On the current understanding of somaclonal variation. **Plant Molecular and Cellular Biology**, London, v. 7, p. 1-59, 1991.

KARTHA, K. K.; CHIBBAR, R. N.; GEORGES, F.; LEUNG, N.; CASWELL, K.; KENDALL, E.; QURESHI, J. Transient expression of chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene in barley cell cultures and immature embryos through microprojectile bombardment. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 8, p. 429-432, 1989.

KELEMU, S.; FORY, P.; ZULETA, C.; RICAURTE, J.; RAO, I.; LASCANO, C. Detecting bacterial endophytes in tropical grasses of the *Brachiaria* genus and determining their role in improving plant growth. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 6, p. 965-976, 2011.

KHANNA, H. K.; RAINA, S. K. Genotype x culture media interaction effects on regeneration response of three Indica rice cultivars. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 52, p. 145-153, 1998.

KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; SANFORD, J. C. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. **Nature Biotechnology**, New York, v. 327, p. 70-73, 1987.

KOEHLER, A. D. **Reprodução em *Brachiaria* spp.: SERK (Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase) no desenvolvimento da antera, do ovário e na embriogênese.** 2010. 108 p. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, CENA, Piracicaba, 2010.

KOHLI, A.; GAHAKWA, D.; VAIN, P.; LAURIE, D. A.; CHRISTOU, P. Transgene expression in rice engineered through particle bombardment: molecular factors controlling stable expression and transgene silencing. **Planta**, Berlin, v. 208, n. 1, p. 88-97, 1999.

KOLTUNOW, A.; GROSSNIKLAUS, U. Apomixis: a developmental perspective. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 54, p. 547-574, 2003.

KOMARI, T.; HIEI, Y.; SAITO, Y.; MURAI, N.; KUMASHIRO, T. Vectors carrying two separate T-DNA for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. **Plant Journal**, New York, v. 10, p. 165-174, 1996.

KOWATA, M.; OHMIYA, A.; SHIMAMOTO, Y.; OONO, K.; TAKAIWA, F. Structural changes in the plastid DNA of rice (*Oryza sativa* L.) during tissue culture. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 90, p. 364-371, 1995.

LEMAUX, P. G.; CHO, M-J.; ZHANG, S.; BREGITZER, P. Transgenic in vitro shoot meristematic cultures derived from germinated seed cereals: *Hordeum vulgare* L. (barley). In: **Molecular improvement of cereal crops**, Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic, 1999. p.255–316.

LENIS-MANZANO, S. **Desenvolvimento de um Método de Transformação Genética de *Brachiaria* spp. por bombardeamento de partículas**. 1998. 131 p. Dissertação (Mestrado). Universidade de Brasília, Brasília, DF, 1998.

LENIS-MANZANO, S. J.; ARAUJO, A. C. G.; VALLE, C. B.; SANTANA, E. F.; CARNEIRO, V. T. C. Histologia da embriogênese somática induzida em embriões de sementes maduras de *Urochloa brizantha* apomítica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 5, p. 435-441, 2010.

LI, H. P.; HUANG, T.; WANG, C. X.; LIAO, Y. C. An efficient regeneration system of barley cultivars from leaf base segments. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 54, p. 733-736, 2009.

LI, J-F.; PARK, E.; VON ARNIM, A. G.; NEBENFÜHR, A. The FAST technique: a simplified *Agrobacterium*-based transformation method for transient gene expression analysis in seedlings of *Arabidopsis* and other plant species. **Plant Methods**, v. 5, n. 6, doi:10.1186/1746-4811-5-6. 2009.

LI, M.; LI, H.; HU, X.; PAN, X.; WU, G. An *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system using callus of *Zoysia tenuifolia* Willd. ex Trin. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 102, n. 3, p. 321-327, 2010.

LI, X.; KRASNYANSKI, S. F.; KORBAN, S. S. Somatic embryogenesis, secondary somatic embryogenesis, and shoot organogenesis in *Rosa*. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 159, p. 313-319, 2002.

LINSMAIER, E. M.; SKOOG, J. L. Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 18, p. 100-127, 1965.

LIU, N-T.; JANE, W-N.; TSAY, H-S.; WU, H.; CHANG, W-C.; LIN, C-S. Chloroplast genome aberration in micropropagation-derived albino *Bambusa edulis* mutants, *ab1* and *ab2*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 88, n. 2, p. 147-156, 2007.

LONSDALE, D.; ONDE, S.; CUMMING, A. Transient expression of exogenous DNA in intact, viable wheat embryos following particle bombardment. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 41, p. 1161-1165, 1990.

LU, C.; VASIL, V.; VASIL, I. K. Improved efficiency of somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of maize (*Zea mays* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 66, p. 285-289, 1983.

MA, L.; DONG, J.; JIN, Y.; CHEN, M.; SHEN, X.; WANG, T. RMDAP: a versatile, ready-to-use toolbox for multigene genetic transformation. **PLoS ONE** (ed.) Hany A. El-Shemy, Cairo University, Egypt, v. 6, n. 5, p. 10. doi:10.1371/journal.pone.00198836. 2011.

Macedo, M. C. M. Aspectos edáficos relacionados com a produção de *Brachiaria brizantha* cultivar Marandu. In: Barbosa RA (ed.) **Morte de pastos de braquiárias**, 1st ed. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, 2006.

MADSHUS, I. H. Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells. **Biochemistry Journal**, La Jolla, v. 250, p. 1-8, 1988.

Mann, D. G. J.; LaFayette, P. R.; Abercrombie, L. L.; King, . R.; Mazarei, M.; Halter, M. C., Poovaiah, C. R.; Baxter, H.; Shen, H.; Dixon, R. A.; Parrott, W. A.; Stewart Jr, C. N. Gateway-compatible vectors for high-throughput gene functional analysis in switchgrass (*Panicum virgatum* L.) and other monocot species. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 10, p. 226–236, doi: 10.1111/j.1467-7652.2011.00658.x, 2012.

MARTINEZ, T.; CORREDOIRA, E.; VALLADARES, S.; JORQUERA, L.; VIEITEZ, A. M. From mature *Quercus robur* trees: the effects of cold storage and thidiazuron. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 95, p.341–351, 2008.

MATSUMOTO, K. Cultura de células em suspensão - focalizando a bananeira. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 126. Embrapa, Brasília, DF, 1-21 p. 2006.

McCULLEN, C. A.; BINNS, A. N. *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 22, p. 101-127, 2006.

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

MOLINARI, L.; BUSTI, A.; CALDERINI, O.; ARCIONI, S.; PUPILI, F. Plant regeneration from callus of apomictic and sexual lines of *Paspalum simplex* and RFLP analysis of regenerated plants. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 21, p. 1040-1046, 2003.

MOLLO, L.; MARTINS, M.; OLIVEIRA, V.; NIEVOLA, C. L.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. D. Effects of low temperature on growth and non-structural carbohydrates of the imperial bromeliad *Alcantarea imperialis* cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 107, n. 1, p. 141-149, 2011.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NANDAKUMAR, R.; CHEN, L.; ROGERS, S. M. D. *Agrobacterium*-mediated transformation of the wetland monocot *Typha latifolia* L. (Broadleaf cattail). **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 23, p. 744-750, 2005.

NGENDAHOYO, M. **Mécanismes de la reproduction dans Le genre *Brachiaria***. Doctor thesis. Université Catholique de Louvain, Louvain - Belgium, 1988.

NIKOLIĆ, R.; MITIĆ, N.; MILETIĆ, R.; NEŠKOVIĆ, M. Effects of cytokinins on *in vitro* seed germination and early seedling morphogenesis in *Lotus corniculatus* L. **Journal of Plant Growth Regulation**, Berlin, v. 25, n. 3, p. 187-194, 2006.

NOGLER, G. A. Gametophytic apomixis. In: JOHRI, B. M. (ed.) **Embryology of angiosperms**. Berlin: Springer-Verlag, 1984. p. 475-518.

OKADA, K.; UEDA, J.; KOMAKI, M. K.; BELL, C. J.; SHIMURA, Y. Requirement of the auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 3, p. 677-684, 1991.

OZAWA, K.; TAKAIWA, F. Highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of suspension-cultured cell clusters of rice (*Oryza sativa* L.) on *in vitro* plant culture and genetic transformation protocols. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 29, p. 1203-1213, 2010.

OZIAS-AKINS, P.; VASIL, I. K. Improved efficiency and normalization of somatic embryogenesis in *Triticum aestivum* (wheat). **Protoplasma**, Wein, v. 117, p. 40-44, 1983.

OZIAS-AKINS, P.; VASIL, I. K. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum* L. (wheat): Evidence for somatic embryogenesis. **Protoplasma**, Wein, v. 110, p. 95-105, 1982.

PADILLA, I. M. G.; BURGOS, L. Aminoglycoside antibiotics: structure, functions and effects **Plant Science**, Amsterdam, v. 179, p. 333-337, 2010.

PALOMO-RÍOS, E.; BARCELÓ-MUÑOZ, A.; MERCADO, J. A.; PLIEGO-ALFARO, F. Evaluation of key factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos of avocado (*Persea americana* Mill.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 109, n. 2, p. 201-211, 2012.

PERL, A.; KLESS, H.; BLUMENTHAL, A.; GALILI, G.; GALUN, E. Improvement of plant regeneration and GUS expression in scutellar wheat calli by optimization of culture conditions and DNA-microprojectile delivery procedures. **Molecular and General Genetics**, Heidelberg, v. 235, p. 279-284, 1992.

PINHEIRO, A. A.; POZZOBON, M. T.; DO VALLE, C. B.; PENTEADO, M. I. O.; CARNEIRO, V. T. C. Duplication of the chromosome number of diploid *Brachiaria brizantha* plants using colchicine. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 19, n. 3, p. 274-278, 2000.

PITZSCHKE, A.; HIRT, H. New insights into an old story: *Agrobacterium* induced tumour formation in plants by plant transformation. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 29, p. 1021-1032, 2010.

POPELKA, J. C.; ALTPETER, F. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of rye (*Secale cereale* L.). **Molecular Breeding**, Heidelberg, v. 11, p. 203-211, 2003.

PUIGDERRAJOLS, P.; MIR, G.; MOLINAS, M. Ultrastructure of early secondary embryogenesis by multicellular and unicellular pathways in cork oak (*Quercus suber* L.). **Annals of Botany**, Oxford, v. 87, p. 179-189, 2001.

RAEMAKERS, C. J. J. M.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. **Euphytica**, Wageningen, v. 81, p. 93-107, 1995.

RASHID, H.; YOKOI, S.; TORIYAMA, K.; HINATA, K. Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in Indica rice. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 15, p. 727-730, 1996.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal** Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, v.1. 2007. 830 p.

REDHA, A.; SULEMAN, P. Effects of exogenous application of polyamines on wheat anther cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 105, n. 3, p. 345-353, 2010.

RENVOIZE, S. A.; CLAYTON, W. D.; KABUYE, C. H. S. Morphology, taxonomy, and natural distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B., (Ed.). **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Cali-Colombia: CIAT; Campo Grande-Brasil: Embrapa, 1996. v.1, p.1-15.

RIBNICKY, D. M.; ILIC', N.; COHEN, J. D.; COOKE, T. J. The effects of exogenous auxins on endogenous indole-3-acetic acid metabolism. **Plant Physiology**, Rockville, v. 112, p. 549-558, 1996.

RODRIGUES, J. C. M.; CABRAL, G. B.; DUSI, D. M. A.; MELLO, L. V.; RIGDEN, D. J.; CARNEIRO, V. T. C. Identification of differentially expressed cDNA sequences in ovaries of sexual and apomictic plants of *Brachiaria brizantha*. **Plant Molecular Biology**, Heidelberg, v. 53, n. 6, p. 745-757, 2003.

SAIRAM, R. V.; WILBER, C.; FRANKLIN, J.; SMITH, B.; BAZIL, J.; HASSEL, R.; WHALING, D.; FRUTIGER, K.; BLAKEY, C. A.; VIERTLING, R.; GOLDMAN, S. L. High frequency callus induction and plant regeneration in *Tripsacum dactyloides* L. **In vitro Cellular Developmental Biology - Plant**, Wallingford, v. 38, p. 435-440, 2002.

SAIRAM, R. V.; CHENNAREDDY, S.; PARANI, M.; ZHANG, S.; AL-ABED, D.; ABOU-ALAIW, W.; GOLDMAN, S. L. OBPC Symposium: Maize 2004 & Beyond - Plant regeneration, gene discovery, and genetic engineering of plants for crop improvement. **In vitro Cellular Developmental Biology - Plant**, Wallingford, v. 41, p. 411-423, 2005.

SALLAUD, C.; MEUNARD, D.; VAN BOXTEL, J.; GAY, C.; BÈS, M.; BRIZARD, J. P.; LARMANDE, P.; ORTEGA, D.; RAYNAL, M.; PORTEFAIX, M.; OUWERKERK, P. B. F.; RUEB, S.; DELSENY, M.; GUIDERDONI, E. Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 106, p. 1396-1408, 2003.

SAMANTARAY, S.; ROUT, G. R.; DAS, P. Regeneration of plants via somatic embryogenesis from leaf base and leaf tip segments of *Echinochloa colona*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 47, p. 119-125, 1997.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. In: **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, Vol. 1, 2, 3. 1989.

SANCHEZ-MARQUEZ, S.; BILLS, G. F. B.; HERRERO, N.; ZABALGOGUEAZCOA, I. Non-systemic fungal endophytes of grasses. **Fungal Ecology**, Amsterdam, doi:10.1016/j.funeco.2010.12.001. 2011.

SANFORD, J. C.; DEVIT, M. J.; RUSSELL, J. A.; SMITH, F. D.; HARPENDING, M. K.; ROY, M. K.; JOHNSTON, S. A. An improved, helium-driven biolistic device. **Technique**, v. 3, p.3-16, 1991.

SANFORD, J. C.; KLEIN, T. M.; WOLF, E. D., ALLEN, N. Delivery of substances into cells tissues using a particle bombardment process. **Particulate Science and Technology**, v. 5, p. 27-37, 1987.

SCHÖPKE, C.; TAYLOR, N.; CÁRCAMO, R.; KONAN, N. D. K.; MARMEY, P.; HENSHAW, G. G.; BEACHY, R. N.; FAUQUET, C. Regeneration of transgenic cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz) from microbombarded embryogenic suspension cultures. **Nature Biotechnology**, New York, v. 14, p. 731-735, 1996.

SHARMA, K. K.; BHATNAGAR-MATHUR, P.; THORPE, T. A. Genetic transformation technology: status and problems. **In Vitro Cellular Developmental Biology - Plant**, Wallingford, v. 41, p. 102-112, 2005.

SHIMAMOTO, K.; KYOZUKA, J. Rice as a model for comparative genomics of plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, p. 399-419, 2002.

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**, Coréia, v. 5, p. 87-93, 2003.

SILVEIRA, E. D.; GUIMARÃES, L. A.; DUSI, D. M. A.; DA SILVA, F. R.; MARTINS, N. F.; COSTA, M. M. C.; ALVES-FERREIRA, M.; CARNEIRO, V. T. C. Expressed sequence-tag analysis of ovaries of *Brachiaria brizantha* reveals genes associated with the early steps of embryo sac differentiation of apomictic plants. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 31, n. 2, p.403-416, DOI:10.1007/s00299-011-1175-y. 2012.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, Cambridge, v. 11, p. 118-131, 1957.

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

SNOW, M.; SNOW, R. Auxin and leaf formation. **The New Phytologist**, London, v. 36, p. 1-18, 1937.

SOARES, A. A.; CORNÉLIO, V. M. O.; SOARES, P. C.; SANTOS, P. G.; REIS, M. S. Primavera: Cultivar de arroz de grãos agulhinha para cultivo em terras altas. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 48, n. 277, p. 381-388, 2001.

SONG, G-Q.; WALWORTH, A.; HANCOCK, J. F. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of switchgrass cultivars. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 108, n. 3, p.445-453. DOI 10.1007/s11240-011-0056-y. 2012.

SOOD, P.; BHATTACHARYA, A.; SOOD, A. Problems and possibilities of monocot transformation. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 55, n. 1, p. 1-15, 2011.

STEWART, F. C. Growth and organized development of cultured cells. III. Interpretations of the growth from free cell to carrot plant. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 45, p. 709-713, 1958.

TALWAR, M.; RASHID, A. Factors affecting formation of somatic embryos and embryogenic callus from unemerged inflorescences of a graminaceous crop *Pennisetum*. **Annals of Botany**, Oxford, v. 66, p. 17-21, 1990.

TAYLOR, M. G.; VASIL, I.K. Histology of, and physical factors affecting, transient GUS expression in pearl millet (*Pennisetum americanum* L. R.Br.) embryos following microprojectile bombardment. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 10, p. 120-125, 1991.

TAYLOR, N. J.; MASONA, M. V.; CARCAMO, R.; HO, T.; SCHÖPKE, C.; FAUQUET, C. M. Production of embryogenic tissues and regeneration of transgenic plants in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Euphytica**, Wageningen, v. 120, p. 25-34, 2001.

THILMONY, R.; GUTTMAN, M.; THOMSON, J. G.; BLECHL, A. E. The LP2 leucine-rich repeat receptor kinase gene promoter directs organ-specific, light-responsive expression in transgenic rice. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 7, n. 9, p. 867-882, 2009.

THILMONY, R.; GUTTMAN, M.; CHINIQUY, D.; BLECHL, A. pGPro1, a novel binary vector for monocot promoter characterization. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 24, n. 1, p. 57-69, 2006.

TIE, W.; ZHOU, F.; WANG, L.; XIE, W., CHEN, H., LI, X.; LIN, Y. Reasons for lower transformation efficiency in Indica rice using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation: lessons from transformation assays and genome-wide expression profiling. **Plant Molecular Biology**, Heidelberg, v. 78, n. 1, p. 1-18, 2012.

TOHME, J.; PALACIOS, N.; LENIS, S.; ROCA, W. Applications of biotechnology to *Brachiaria*. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B., (Ed.). **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Cali-Colombia: CIAT; Campo Grande-Brasil: Embrapa, 1996. v.1, p.181-217.

TOYAMA, K.; CHANG-HYU, B.; MI-SUK, S.; IN-JA, S.; YONG-PYO, L.; PILL-SOON, S.; HYO-YEON, L. Overcoming of Barriers to Transformation in Monocot Plants. **Journal of Plant Biotechnology**, Coréia, v. 4, n. 4, p. 135-141, 2002.

TUCKER, M. R.; ARAUJO, A. C. G.; PAECH, N. A.; HECHT, V.; SCHMIDT, E. D. L.; ROSSELL, J. B.; DE VRIES, S. C.; KOLTUNOW, A. M. G. Sexual and apomictic reproduction in *Hieracium subgenus pilosella* are closely interrelated developmental pathways. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 15, p. 1524-1537, 2003.

UPADHYAYA, N. M. In: **Rice functional genomics: challenges, progress and prospects** (Ed.). Berlin: Springer-Verlag. ISBN 9780387489032. 2007. 499 p.

VAIN, P. Thirty years of plant transformation technology development. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 5, p. 221-229, 2007.

VAIN, P.; McMULLEN, M. D.; FINER, J. J. Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 12, p. 84-88, 1993.

VALDEZ, M.; MADRIZ, K.; RAMÍREZ, P. A method for genetic transformation of maize for resistance to viral diseases. **Revista de Biología Tropical**, San José, v. 52, n. 3, p. 787-793, 2004.

VALLE, C. B.; JANK L.; RESENDE, R. M. S. O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 56, p. 460-472, 2009.

VALLE, C. B.; BONATO, A. L. V.; PAGLIARINI, S.; RESENDE, R. M. S.; JANK, L. Apomixia e sua utilização no melhoramento de *Brachiaria*. In: CARNEIRO, V.T.C. ; DUSI, D.M.A. (Ed.). **Clonagem de plantas por sementes: estratégias de estudo da apomixia**. Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. p. 47-65.

VALLE, C. B.; SAVIDAN, Y. Genetics, cytogenetic, and reproductive biology of *Brachiaria*. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B., (Ed.). **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Cali-Colombia: CIAT; Campo Grande-Brasil: Embrapa, 1996. v.1, p.147-163.

VAN DEN ELZEN, P. J. M.; TOWNSEND, J.; LEE, K. Y.; BEDBROOK, J. R. A. Chimeric hygromycin resistance gene as a selectable marker in plant cells. **Plant Molecular Biology**, Heidelberg, v. 5, n. 5, p. 299-302, 1985.

VANDERGHEYNST, J. S.; GUO, H-Y.; SIMMONS, C. W. Response surface studies that elucidate the role of infiltration conditions on *Agrobacterium tumefaciens* mediated transient transgene expression in harvested switchgrass (*Panicum virgatum*). **Biomass and Energy**, Amsterdam, v. 32, p. 372-379, 2008.

VASIL, I. K. The story of transgenic cereals: the challenge, the debate, and the solution - A historical perspective. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Wallingford, v. 41, n. 5, p. 577-583, ISSN 1054-5476/1475-2689. 2005.

VASIL, V.; VASIL, I. K. Characterization of an embryogenic cell suspension culture derived from cultured inflorescences of *Pennisetum americanum* (Pearl millet, Gramineae). **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 69, p. 1441-1449, 1982.

VASIL, V.; VASIL, I.K. Isolation and culture of cereal protoplasts. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 56, p. 97-99, 1980.

VERNADE, D.; HERRERA-ESTRELLA, A.; WANG, K.; VAN MONTAGU, M. Glycine betaine allows enhanced induction of the *Agrobacterium tumefaciens* vir genes by acetosyringone at low pH. **Journal of Bacteriology**, Washington DC, v. 170, p. 5822-5829, 1988.

VIGNA, B.; JUNGSMANN, L.; FRANCISCO, P.; ZUCCHI, M.; VALLE, C. B.; SOUZA, A. Genetic diversity and population structure of the *Brachiaria brizantha* germplasm. **Tropical Plant Biology**, Heidelberg, v. 4, n. 3, p. 157-169, 2011.

VIKRANT, C.; RASHID, A. Somatic embryogenesis or shoot formation following high 2,4-D pulse-treatment of mature embryos of *Paspalum scrobiculatum*. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 46, n. 2, p. 297-300, 2003.

VOGEL, J.; HILL, T. High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brachypodium distachyon* inbred line Bd21-3. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 27, p. 471-478, 2008.

WANG, W.; ZHAO, X.; ZHUANG, G.; WANG, S.; CHEN, F. Simple hormonal regulation of somatic embryogenesis and/or shoot organogenesis in caryopsis cultures of *Pogonatherum paniceum* (Poaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 95, p. 57-67, 2008.

WANG, Z-Y.; GE, Y. Recent advances in genetic transformation of forage and turf grasses. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Wallingford, v. 42, n. 1, p.1-18, 2006.

WEIGEL, D.; GLAZEBROOK, J. How to transform *Arabidopsis* - Chapter 5. In: **Arabidopsis**. WEIGEL, D.; GLAZEBROOK, J. (Ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2002.

YADAV, C. B.; JHA, P.; MAHALAKSHMI, C.; ANJIAH, V.; BHAT, V. Somatic embryogenesis and regeneration of *Cenchrus ciliaris* genotypes from immature inflorescence explants. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 53, p. 603-609, 2009.

YADAV, S. K.; KACHHWAHA, S.; KOTHARI, S. L. Comparison of *in vitro* regeneration efficiency of leaf explants in response to different cytokinins and assessment of genetic uniformity of regenerated plants of *Solanum surattense* Burm. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 9, n. 53, p. 8991-8997, 2010.

YANG, Y.; PENG, H.; HUANG, H.; WU, J.; JIA, S.; HUANG, D.; LU, T. Large-scale production of enhancer trapping lines for rice functional genomics. **Plant Science**, Amsterdam, v. 167, p. 281-288, 2004.