



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular

***Brachiaria brizantha*: CARACTERIZAÇÃO DE cDNA DE OVÁRIOS
E IDENTIFICAÇÃO DE EXPLANTES PARA TRANSFORMAÇÃO
VIA BIOBALÍSTICA**

Ana Luiza Machado Lacerda

Brasília, 2007



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular

***Brachiaria brizantha*: CARACTERIZAÇÃO DE cDNA DE OVÁRIOS
E IDENTIFICAÇÃO DE EXPLANTES PARA TRANSFORMAÇÃO
VIA BIOBALÍSTICA**

Ana Luiza Machado Lacerda

Dissertação apresentada ao Curso de pós-graduação em Biologia Molecular
oferecido pelo Departamento de Biologia Celular - Instituto de Ciências Biológicas
- Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do Grau de
Mestre em Biologia Molecular.

Orientação: Dra. Vera Tavares de Campos Carneiro

Co-orientação: Glaucia Barbosa Cabral

Brasília, 2007

Agradecimentos

Aos meus pais, Maria Luiza e Eustáquio, que sempre acreditaram no meu sucesso e me deram todas as condições para que eu pudesse realizar os meus sonhos, sempre do meu lado enfrentando qualquer desafio. Sempre interessados no meu trabalho mesmo quando não entendiam muita coisa.... Amo muito vocês! Muito obrigada por tudo!

A minha orientadora Dra. Vera Tavares de Campos Carneiro por acreditar no meu trabalho e me dar a oportunidade e os ensinamentos necessários para poder seguir em frente. Pelo incentivo, atenção, paciência, carinho e amizade! Muito obrigada por tudo!

A Gláucia Cabral pelos ensinamentos nos trabalhos de cultura de tecidos, pelo apoio e disponibilidade durante e na conclusão deste trabalho. Pela amizade, compreensão, paciência e carinho! Muito obrigada!

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelas condições necessárias para poder executar o trabalho.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

Ao departamento de Biologia Celular pela oportunidade de fazer o Mestrado.

As grandes amigas do laboratório de Apomixia: Érica, Eliz e Larissa por todo o apoio, ajuda em todos os momentos e principalmente pela amizade.

A Dra. Diva Dusi pelo apoio, pelos ensinamentos na área de microscopia, por tirar minhas dúvidas e pela revisão final do texto da dissertação.

A Dra. Ana Cláudia Guerra de Araújo pela ajuda nos experimentos de microscopia, por tirar minhas dúvidas e apoio.

As meninas da microscopia, Ana Cristina Gomes e Rosana Falcão pelas dicas no processamento das amostras e na microscopia eletrônica de varredura. Ana, você se tornou uma grande amiga!

A equipe da Plataforma Genômica da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e da Universidade Católica de Brasília pelo sequenciamento das amostras.

Ao Dr. Felipe Silva pela ajuda na análise das seqüências obtidas no 5' RACE.

Aos amigos do laboratório de transformação genética sempre dispostos a ajudar e ceder espaço nos experimentos de biobalística.

Aos Drs. Giovanni Rodrigues Vianna, Leila Maria Gomes Barros e Fernando Araripe Gonçalves Torres por participarem da banca examinadora deste trabalho e por todas as contribuições feitas.

As amigas Andrielle, Vânia, Ana Maria Cristina e Flávia pela amizade de todos os momentos, as palavras de incentivo e apoio total!

A amiga de todos os momentos, Alessandra, por tudo! Você é a amiga de ontem, hoje e sempre! Muito obrigada pelo carinho e pela amizade! A sua amizade é muito importante pra mim!

Ao Luís que mesmo de longe, me deu carinho, atenção, apoio, me incentivou a prosseguir, sempre com palavras de força e incentivo! Você é muito importante na minha vida!

Aos meus irmãos pelo carinho e apoio! Amo vocês!

Ao Nelson pelo incentivo, apoio e amizade.

A toda a minha família que sempre acreditou em mim, muito obrigada pelo carinho!

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho!

ÍNDICE GERAL

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS	xi
ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Brachiaria brizantha</i>	1
1.1.1. Taxonomia	1
1.1.2. Aspectos gerais.....	1
1.2. Modos de reprodução	2
1.2.1. Reprodução sexual em angiospermas	3
1.2.2. Apomixia	3
1.2.2.1. Tipos de apomixia	3
1.2.2.2. Controle genético da apomixia.....	5
1.2.2.3. Interesse no estudo da apomixia	5
1.2.2.4. Reprodução em <i>Brachiaria</i>	6
1.3. Ploidia em <i>Brachiaria</i>.....	7
1.4. Melhoramento genético em <i>Brachiaria</i>	7
1.5. Identificação de seqüências de cDNA específicas de ovário	8
1.6. Cultura de Tecidos	8
1.7. Determinação da estrutura do explante	12
1.8. Transformação genética	13
1.8.1. Métodos de transformação	13
1.8.2. Escolha de promotores para a transformação.....	16
1.8.3. Genes marcadores.....	16
1.8.4. Técnicas moleculares de detecção de genes.....	17
1.8.5. Transformação genética em espécies apomíticas	17
2. OBJETIVOS.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Material vegetal.....	19
3.2. Caracterização da órgão-especificidade de clones de DD-PCR.....	19
3.2.1. Extração de ovários e anteras	19
3.2.2. Extração de RNA de ovários e anteras.....	19
3.2.3. Extração de RNA de folhas.....	20
3.2.4. Seleção dos clones	21
3.2.5. Preparo das membranas	21
3.2.6. Marcação radioativa de sondas	22
3.3. Amplificação dos terminais dos cDNAs por 5' RACE (<i>Rapid Amplification of cDNA ends</i>) do clone 21	22

3.3.1. Purificação de mRNA de ovários de <i>B. brizantha</i>	22
3.3.2. Síntese da primeira fita de cDNA.....	23
3.3.3. Síntese da segunda fita de cDNA.....	23
3.3.4. Ligação dos adaptadores ao cDNA	24
3.3.5. Desenho dos iniciadores.....	24
3.3.6. Reação de 5' RACE – <i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>	25
3.3.7. Preparo de células competentes para transformação por eletroporação.....	26
3.3.8. Transformação por eletroporação, das ligações das bandas resultantes do 5'RACE do clone 21 clonadas no vetor pCR [®] 2.1 (Invitrogen).....	26
3.3.9. Mini-preparação de DNA plasmidial	27
3.3.10. Sequenciamento de DNA	27
3.3.11. Análise das seqüências	27
3.4. Parâmetros de biobalística usados para transformação genética de diferentes explantes	28
3.4.1. Precipitação do DNA sobre as micropartículas de Tungstênio	28
3.4.2. Vetores	28
3.4.3. Condições de bombardeamento	29
3.4.4. Análise histoquímica do gene <i>gus</i>	29
3.5. Análise do potencial de diferentes explantes de <i>B. brizantha</i> para transformação genética	30
3.5.1. Explantes analisados	30
3.5.1.1. Introdução, manutenção e micropropagação in vitro	30
3.5.1.2. Meios de Cultura utilizados	31
3.5.1.3. Análise estrutural de segmentos basais de plantas cultivadas in vitro	33
3.5.1.3.1. Microscopia de Luz.....	34
3.5.1.3.2. Preparo das lâminas.....	34
3.5.1.3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura	35
3.5.1.4. Embriões isolados de sementes maduras:	35
3.5.1.4.1. Desinfestação das sementes.....	35
3.5.1.4.2. Efeito do período de indução de embriogênese somática anterior ao bombardeamento.....	36
3.5.1.4.3. Estabilidade do gene <i>gus</i> em embriões bombardeados	36
3.5.1.5. Obtenção de calos embriogênicos para transformação genética.....	36
3.5.1.5.1. Comparação entre bombardeamento de embriões e calos embriogênicos.....	37
3.5.1.5.1.1. Extração de DNA de folha para PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	37
3.5.1.5.2. Efeito do período de indução de calos embriogênicos para bombardeamento	38
3.5.1.5.3. Efeito do tratamento osmótico no bombardeamento e da seleção dos transformantes em altas doses de higromicina	38
3.5.1.6. Obtenção de suspensão celular.....	38
3.5.1.6.1. Parâmetros testados para transformação de suspensão celular	39
4. RESULTADOS.....	40
4.1. Caracterização da expressão órgão-específica de seqüências de cDNA isoladas por DD-PCR de ovários de <i>B. brizantha</i>.....	40
4.1.1. Seleção de cDNA de expressão em ovário	40
4.1.1.1. <i>Northern</i> reverso em dot blot de DNA plasmidial.....	40
4.1.1.2. <i>Northern</i> reverso em produto de amplificação por PCR	41
4.2. Caracterização dos clones 09 e 21	43
4.2.1. Análise das seqüências dos clones 09 e 21	43
4.2.2. Amplificação do cDNA do clone 21 por 5'RACE (<i>Rapid Amplification of cDNA ends</i>).....	45
4.2.2.1. Verificação da qualidade do RNA e cDNA.....	45
4.2.2.2. Amplificação por 5' RACE do clone 21 e análise das seqüências obtidas	45
4.3. Introdução, manutenção e micropropagação in vitro	46
4.4. Análise do potencial de diferentes explantes de <i>B. brizantha</i> para transformação genética	48

4.4.1. Estrutura dos segmentos basais de plantas cultivadas in vitro	48
4.4.2. Embriões isolados de sementes maduras	52
4.4.2.1. Efeito do período de indução de embriogênese somática anterior ao bombardeamento	52
4.4.2.2. Estabilidade do gene <i>gus</i> em embriões bombardeados	55
4.4.3. Calos embriogênicos.....	58
4.4.3.1. Comparação do bombardeamento de embriões e calos embriogênicos.....	59
4.4.3.2. Bombardeamento de calos embriogênicos.....	61
4.4.3.3. Efeitos do tratamento osmótico no bombardeamento e na seleção dos transformantes em calos embriogênicos.....	63
4.4.4. Células em suspensão.....	65
4.4.4.1. Efeito do pH na obtenção de suspensão celular.....	65
4.4.4.2. Efeito da redução da auxina 2,4D na regeneração da suspensão celular	66
4.4.4.3. Parâmetros usados para transformação genética de suspensão celular	66
5. DISCUSSÃO	70
6. CONCLUSÕES	78
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

Lista de Figuras

Figura 1 - Esquema da reprodução sexual e apomítica (apospórica) que ocorre no gênero <i>Brachiaria</i>	4
Figura 2 - Seqüência dos iniciadores utilizados para amplificação por 5'RACE do clone 21.....	25
Figura 3 - Representação esquemática dos plasmídeos utilizados para transformação genética de <i>B. brizantha</i>	29
Figura 4 - Esquema dos cortes apical, mediano e basal feitos nos segmentos basais da plantas cultivadas in vitro.....	33
Figura 5 - Análise por <i>northern</i> reverso de seqüências de cDNA de expressão diferencial em ovários de plantas de <i>B. brizantha</i> apomíticas cv. Marandu e sexuais (BRA 002747) em técnica de dot-blot.....	41
Figura 6 - Análise por <i>northern</i> reverso de seqüências de cDNA de expressão diferencial em ovários de plantas de <i>B. brizantha</i> apomíticas cv. Marandu e sexuais (BRA 002747) amplificadas por PCR.....	42
Figura 7 - Análise de RNA total e cDNA de ovários de <i>B. brizantha</i> cv. Marandu.....	45
Figura 8 - Amplificação do clone 21 por 5' RACE.....	46
Figura 9 - Introdução, micropropagação e manutenção in vitro de <i>B. brizantha</i>	48
Figura 10 - Corte apical dos segmentos basais de <i>B. brizantha</i> cv. Marandu (B 30) e sexual (BRA 002747 – B 105) de plantas cultivadas in vitro e inoculados em meio de micropropagação.....	49

Figura 11 - Corte basal dos segmentos basais de <i>B. brizantha</i> cv. Marandu (B 30) e sexual (BRA 002747 – B 105) de plantas cultivadas in vitro e inoculados em meio de micropropagação. Visualização em microscopia de luz.....	50
Figura 12 - Corte basal dos segmentos basais de plantas cultivadas in vitro de <i>B. brizantha</i> cv. Marandu inoculados em meio de micropropagação mostrando gemas protegidas por folhas.....	51
Figura 13 - Expressão do gene <i>gus</i> em embriões isolados de sementes maduras de <i>B. brizantha</i> cv. Marandu, inoculados em meio M1.2, 24 horas após a transformação por biobalística, utilizando o vetor pAct1-D.....	54
Figura 14 - Embriões isolados de sementes maduras de <i>B. brizantha</i> cv. Marandu, em diferentes meios de cultura de indução de embriogênese, após bombardeamento com o vetor pAct1-D.....	56
Figura 15 – Desenvolvimento de calos embriogênicos em <i>B. brizantha</i> cv Marandu a partir de semente madura.....	59
Figura 16 – Análise por eletroforese em gel de agarose 1% da PCR de plantas regeneradas de embriões de <i>B. brizantha</i> cv. Marandu bombardeados com o plasmídeo pAct1-D.....	61
Figura 17 - Expressão do gene <i>gus</i> em calos embriogênicos de <i>B. brizantha</i> cv. Marandu, 48 horas após o bombardeamento de partículas, utilizando o vetor pAHUG.....	62
Figura 18 - Secção longitudinal de embrião somático de <i>B. brizantha</i> cv. Marandu expressando gene <i>gus</i> em microscopia de luz.....	62

Figura 19 - Regeneração de calos embriogênicos de <i>B. brizantha</i> cv. Marandu submetidos à biobalística.....	64
Figura 20 - Cultivo de suspensão celular de <i>B.brizantha</i> cv. Marandu em meio MSCLind.....	65
Figura 21 - Comparação da eficiência de regeneração de suspensão celular de <i>B. brizantha</i> cv. Marandu em meio MSCLreg com pH 4.0 e pH 5.8.....	65
Figura 22 - Calos de <i>B. brizantha</i> cv. Marandu em regeneração.....	66
Figura 23 - Suspensão celular de <i>B. brizantha</i> cv. Marandu em meio MSCLind líquido.....	67
Figura 24 – Regeneração de suspensão celular em meio MSCLreg.....	68
Figura 25 – Expressão do gene <i>gus</i> em grupo de células em suspensão de <i>B. brizantha</i> cv. Marandu, 48 horas após o bombardeamento de partículas, utilizando o vetor pAHUG.....	69

Lista de Tabelas

Tabela 1: Meios de cultura utilizados nos trabalhos de cultura de tecidos..	32
Tabela 2: Análise das seqüências dos clone 09 e 21 utilizando o programa BLASTN contra o banco nr (não redundante) de nucleotídeos do NCBI (www.ncbi.nlm.gov/ BLAST) (Altschul et al., 1997).....	44
Tabela 3: Descrição das secções dos cortes apical, mediano e basal de segmentos basais de plantas cultivadas in vitro de <i>B. brizantha</i> mostrando o número de primórdios de gemas e gemas encontrados.....	52
Tabela 4: Expressão do gene <i>gus</i> em embriões isolados de semente madura de <i>B.brizantha</i> cv. Marandu, cultivados em diferentes períodos em meio de indução M1.2, 24 horas após serem bombardeados com o plasmídeo pAct1-D.....	55
Tabela 5: Expressão do gene <i>gus</i> em embriões isolados de semente madura de <i>B.brizantha</i> cv. Marandu em diferentes dias (1, 10 e 20 dias) após o bombardeamento e indução em diferentes meios de cultura (M1 e M1.2).....	57
Tabela 6: Expressão do gene <i>gus</i> (pontos azuis) em embriões isolados de semente madura de <i>B.brizantha</i> cv. Marandu e calos embriogênicos bombardeados com os plasmídeos pAct1-D e pAHC27	60

ABREVIATURAS

2,4D	ácido 2,4 diclorofenoxiacético
ANA	ácido naftalenoacético
BAP	6-benzilaminopurina
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
bp	pares de base
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
dATP	2'-deoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	2'-deoxicitidina 5'-trifosfato
DEPC	dietilpirocarbonato
dGTP	2'-deoxiguanosina 5'- trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucléico
dTTP	2'-deoxitimidina 5'- trifosfato
EDTA	ácido etileno diaminotetracético
GA ₃	ácido giberélico
GUS	β-glucuronidase
IPTG	isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo
KIN	cinetina
MEV	microscopia eletrônica de varredura
PCR	reação em cadeia de polimerase
psi	libra por polegada quadrada
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
RT	transcriptase reversa
SDS	dodecil sulfato de sódio
TM	temperatura de anelamento de iniciadores
TRIS	tri (hidroximetil) aminometano
U	unidade
X-Gal	5-bromo- 4-cloro-3-indolil- β-D-galactosídeo
X-Gluc	ácido 5-bromo-4-cloro-3-indoil-β-D-glucurônico

RESUMO

Brachiaria é uma gramínea de grande importância econômica. Amplamente utilizada no Brasil como forrageira sendo cultivada em uma área de aproximadamente 70 milhões de hectares. A grande demanda no uso de *Brachiaria* como pastagem é devida à fácil adaptação a solos ácidos e pobres, resistência a seca e a pragas, e à grande qualidade nutricional adequada para alimentação bovina. Uma das limitações ao melhoramento de *Brachiaria* é a presença da apomixia, modo de reprodução onde há clonagem através de sementes. A transformação genética de plantas amplia a possibilidade de introdução de características de interesse como também o estudo da expressão dos genes que controlam a apomixia. Neste trabalho foram utilizadas duas abordagens de interesse para o estudo da apomixia em *Brachiaria*. A primeira objetiva a caracterização de seqüências de cDNA de expressão específica em ovário e a segunda objetiva otimizar o sistema de transformação. Foi demonstrada a órgão-especificidade de seqüências de cDNA isoladas de ovários de plantas apomíticas e sexuais de *B. brizantha*, clones 09 e 21. Paralelamente, o uso de segmentos basais de plantas in vitro e aspectos do processo de indução de embriogênese somática e regeneração de diferentes explantes foram analisados visando melhor eficiência do sistema de transformação genética de *Brachiaria*. Na análise dos segmentos basais por microscopia, foi observado que apesar da grande proliferação de gemas nesses segmentos basais em meio de micropropagação, suas regiões meristemáticas não são expostas, não sendo acessíveis às partículas durante o bombardeamento. Dentro do sistema de embriogênese somática embriões isolados de sementes maduras, calos embriogênicos e células em suspensão foram analisados. De acordo com os resultados, as células em suspensão mostraram os melhores resultados quanto à homogeneidade de estruturas, à formação de embriões e alta taxa de regeneração, indicando que poderão ser usadas como explantes na transformação genética por biobalística em *Brachiaria*.

Palavras chaves: *Brachiaria brizantha*, apomixia, *northern* reverso, embriogênese somática, biobalística

ABSTRACT

Brachiaria is a forage grass of great economic importance. Widely used as forage for cattle in Brazil, it is cultivated in about 70 million hectares. Its economic value is due to its adaptability to poor and acid soil, spittlebug and dry resistance and high nutritional quality. One limiting factor in *Brachiaria* breeding is apomixis, an asexual reproduction through seeds. Plant transformation increases the possibilities to introduce interesting characteristics and also could be a tool for gene expression studies that control apomixis. In this present work two relevant approaches for the apomixis studies of *Brachiaria* were used. The first one aims to identify sequences of cDNA with specific expressions in ovary and the second one aims to optimize the system of transformation. Therefore, was demonstrated the organ-specificity of ovary cDNA sequences isolated from apomitic and sexual *B. brizantha*, clones 09 and 21. Also, the use of basal segments of in vitro plants, aspects of somatic embryogenic induction, regeneration of different explants was analyzed aiming a better *Brachiaria* transformation efficiency. The evaluation of basal segments for transformation, microscopy analysis showed that, even with high bud proliferation of these segments, their meristematic regions were not exposed and for that not accessible to biolistic DNA coated particles. The explants analyzed in somatic embryogenesis were embryos isolated from mature seeds, embryogenic calli and culture cells. According to the experiments, culture cells showed better results concerning the homogeneity of the structures, embryo formation and regeneration rates and for that they will be used as explants in *Brachiaria* biolistic transformation.

Key words: *Brachiaria brizantha*, apomixis, reverse northern, somatic embryogenesis, biolistic.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Brachiaria brizantha*

1.1.1. Taxonomia

Divisão: Antophyta

Subdivisão: Angiospermae

Classe: Monocotyledonae

Ordem: Pales (Glumiflorales)

Família: Poaceae (Gramineae)

Subfamília: Panicoideae

Tribo: Panicea

Gênero: *Brachiaria*

Espécie: *Brachiaria brizantha*

1.1.2. Aspectos gerais

Brachiaria é um gênero de gramíneas de origem africana, introduzida na América do Sul no século XVIII. Esse gênero apresenta cerca de 100 espécies encontradas em regiões tropicais e subtropicais (Renvoize et al., 1996). A *Brachiaria decumbens* foi introduzida no Brasil em 1952, e por volta de 1965 houve a introdução da *B. brizantha* e *B. ruziziensis* (Lapointe & Miles, 1992).

A *Brachiaria brizantha* cv. Marandu é originária de uma região vulcânica da África, e procedente da Estação Experimental de Forrageiras de Marandellas, no Zimbábue. Foi cultivada por vários anos em Ibirarema – SP, de onde foi distribuída para várias regiões do Estado de São Paulo. Em 1976, foi cedida ao International Research Institute (IRI) em São Paulo, que a incorporou à sua coleção sob o número IRI-822. Em 1977 essa gramínea foi fornecida à Embrapa Gado de Corte (CNPGC) – Campo Grande, MS, onde foi incluída no processo de avaliação de forrageiras da Unidade. Este germoplasma foi registrado na Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia sob o código de acesso BRA 000591, (Nunes, 1984).

Hoje, a *Brachiaria* é largamente utilizada no Brasil como forrageira tropical por sua ampla adaptação a diferentes condições edafo-climáticas, sendo cultivada em uma área com extensão entre 30 e 70 milhões de hectares, sendo que 85% desse

total são compostos de *B. decumbens* cv. Basilisk e *B. brizantha* cv. Marandu (Miles et al., 1996). A *B. brizantha* cv. Marandu, também conhecida como Braquiarão ou Brizantão, tornou-se a partir da década de 80, a forrageira mais plantada no Brasil e também uma cultivar muito utilizada em outros países do mundo, principalmente na América Latina. A cultivar Marandu vem dominando o mercado interno de sementes e de exportação, e se tornou um importante sustentáculo econômico do setor de sementes de forrageiras no Brasil (http://www.abrasem.com.br/materia_tecnica/2004/0008_parceria_embrapa_unipastos.htm).

A grande demanda no uso de *Brachiaria* como pastagens é devida à fácil adaptação a solos ácidos e pobres, resistência a seca e a pragas, e à sua qualidade nutricional adequada para a alimentação bovina (Lapointe & Miles, 1992; Keller-Grein et al., 1996). O Brasil tem o maior rebanho bovino comercial do mundo, com aproximadamente 180 milhões de cabeças de gado (http://www.abrasem.com.br/materia_tecnica/2004/0008_parceria_embrapa_unipastos.htm). Estima-se que a cadeia pecuária (insumos, produção animal, indústria e comércio de carnes e couros) emprega diariamente 7,2 milhões de pessoas. Anualmente, são abatidas 32 a 34 milhões de cabeças, movimentando em torno de R\$ 12 bilhões, se somadas as receitas com cortes de carne, couro, miúdos e outros subprodutos (Polaquini et al., 2006). No Brasil, o agronegócio da pecuária de corte depende significativamente da criação do rebanho em pasto (Valle et al., 2004).

1.2. Modos de reprodução

A maioria das angiospermas se reproduz pela via sexual, exclusivamente, ou em combinação com a reprodução assexual. O tipo de reprodução assexual considerado mais importante é conhecido como agamospermia, produção de sementes de forma não sexuada, ou apomixia, produção de clones de plantas por sementes (Asker & Jerling, 1992). Entre as angiospermas, várias gramíneas apresentam espécies com modo de reprodução sexual e apomítico, como *Paspalum* (Quarin et al., 2001), *Pennisetum* (Dujardin & Hanna, 1984), *Panicum* (Savidan, 1982) e *Brachiaria* (Valle & Savidan, 1996).

1.2.1. Reprodução sexual em angiospermas

Em plantas, a reprodução sexual é caracterizada pela dupla fertilização do saco embrionário, em que uma célula espermática (gameta masculino) se funde com a oosfera (gameta feminino), formando o zigoto ($2n$), enquanto uma segunda célula espermática se funde com os núcleos polares da célula central para dar origem ao endosperma ($3n$) (Raven et al., 1996).

A formação do saco embrionário (gametófito feminino) se inicia com a diferenciação da célula-mãe do megásporo no tecido nucelar, que se divide por meiose formando quatro megásporos reduzidos. Três deles se degeneram e o sobrevivente, após divisões mitóticas e diferenciação, forma um saco embrionário do tipo *Polygonum*. Esse tipo de saco embrionário é formado por oito núcleos de sete células (a oosfera, duas sinérgides, três antípodas e a célula central) (Asker & Jerling, 1992) (Figura 1).

1.2.2. Apomixia

A apomixia é observada em mais de 35 famílias de plantas incluindo mais de 300 espécies de angiospermas (Hanna & Bashaw, 1987). Esse modo de reprodução é caracterizado pela formação do embrião sem a fertilização de oosfera não reduzida (Figura 1).

1.2.2.1. Tipos de apomixia

A apomixia pode ser classificada de acordo com a origem do embrião apomítico em embrionia adventícia de natureza esporofítica ou apomixia gametofítica (Nogler, 1984).

Na embrionia adventícia os embriões são formados diretamente de células somáticas individuais do nucelo ou do tegumento interno do óvulo. A formação e maturação do saco embrionário meiótico ocorre da mesma forma que nas plantas sexuais (Asker & Jerling, 1992; Carneiro & Dusi, 2004).

A apomixia gametofítica é caracterizada pela apomeiose, ou seja, pela formação de um saco embrionário não reduzido (Nogler, 1984). De acordo com a origem do saco embrionário não reduzido, pode ser classificada em diplosporia quando o saco embrionário é desenvolvido da célula-mãe do megásporo em decorrência de distúrbio na meiose. O saco embrionário resultante apresenta oito núcleos não

reduzidos e é morfologicamente parecido com os encontrados em plantas sexuais. Na aposporia, células do nucelo denominadas iniciais apospóricas, entram em mitose diretamente e formam sacos embrionários não reduzidos. Os sacos embrionários do tipo apospórico podem ser do tipo Hieracium, que apresentam oito núcleos em uma disposição bipolarizada, ou do tipo Panicum que contém quatro núcleos (a oosfera, um núcleo polar e duas sinérgides) dispostos em um mesmo pólo (Nogler, 1984; Carneiro & Dusi, 2004) (Figura 1). Com relação ao desenvolvimento do endosperma, em plantas apomíticas há duas possibilidades: o desenvolvimento autônomo, sem a fertilização do núcleo polar; ou a pseudogamia, onde é necessária a fertilização do núcleo polar pelo núcleo espermático (Nogler, 1984).

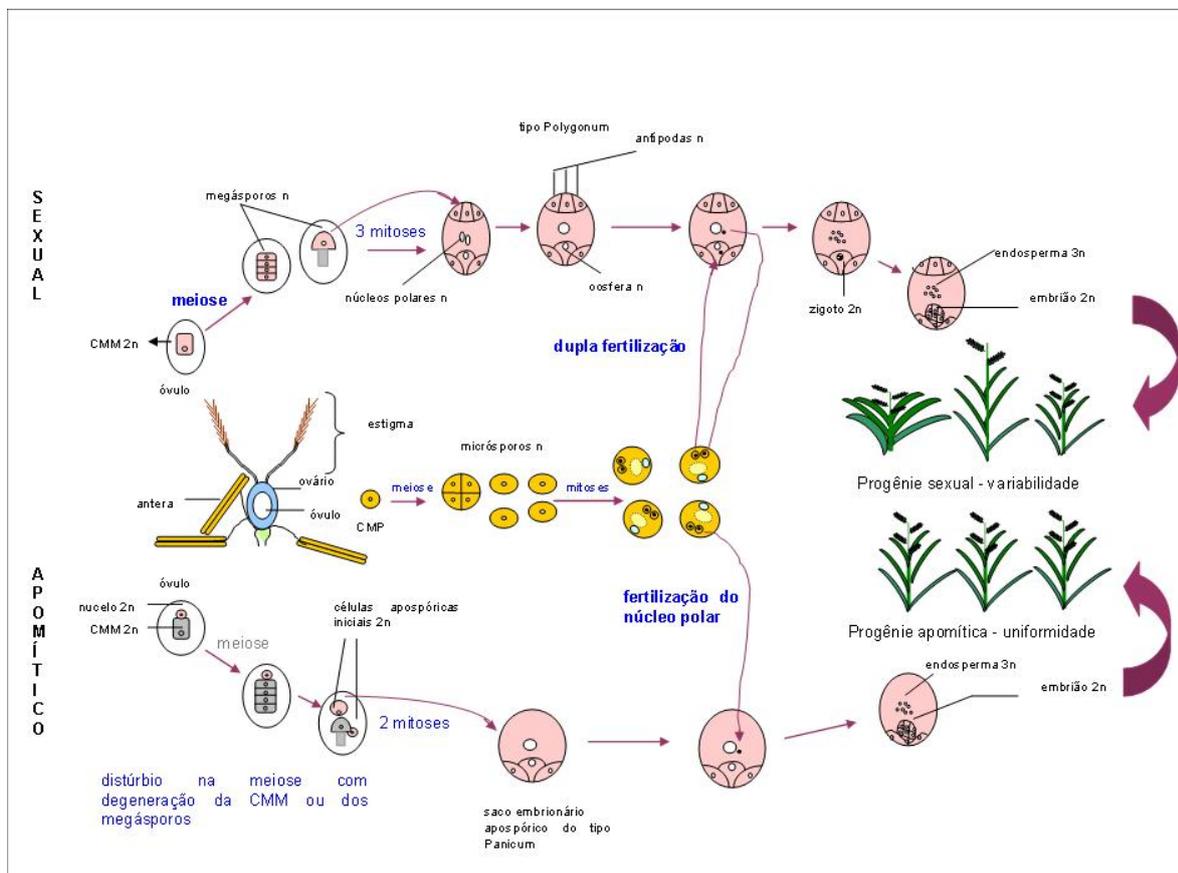


Figura 1 - Esquema da reprodução sexual e apomítica (apospórica) que ocorre no gênero *Brachiaria*. CMM: célula-mãe do megásporo, CMP: célula-mãe do grão de pólen. (Reproduzido de Carneiro & Dusi, 2002).

1.2.2.2. Controle genético da apomixia

A herança genética da apomixia gametofítica tem sido reportada como associada à transferência de um único *locus* ou de um pequeno número de *loci* na maioria dos sistemas estudados (Bicknell & Koltunow, 2004). Em *Panicum maximum* a apomixia é uma característica qualitativa aparentemente controlada por um alelo dominante em um único *locus* (Savidan, 2000).

Trabalhos com *Hieracium* mostram que o número de *loci* que controla a apomixia é de pelo menos três fatores dominantes não ligados (Bicknell & Koltunow, 2004). Estudos recentes em *Poa pratensis* mostram um novo modelo da herança da apomixia, onde cinco importantes genes seriam necessários para a formação assexual da semente. As diferenças na expressão e interação desses genes seriam responsáveis pela variação do modo de reprodução (Matzk et al., 2005).

Em *Brachiaria*, análises de segregação mostram que a apomixia está sob o controle de um único e dominante *locus* (Valle & Miles, 1994). Análises com marcadores moleculares em híbridos interespecíficos de *Brachiaria*, com sondas identificadas de milho forneceram evidências da existência deste *locus*, responsável pela aposporia em *Brachiaria* (Pessino et al., 1997). Assim existiria a possibilidade dela ser manipulada por técnicas de engenharia genética.

A construção de um mapa da região da aposporia em *Brachiaria* mostra que marcadores moleculares de cromossomos de arroz e milho formam um grupo de ligação que segrega com a característica da aposporia (Pessino et al., 1998).

1.2.2.3. Interesse no estudo da apomixia

O estudo da apomixia é de grande interesse, pois uma vez entendido os mecanismos deste tipo de reprodução, tecnologias de impacto para a agricultura poderão se geradas. Se por um lado a reprodução apomítica tem a desvantagem de não gerar uma variabilidade genética em plantas naturalmente apomíticas, por outro lado, o uso controlado da apomixia na agricultura permitirá fixar genótipos elite e híbridos de qualidade, sendo possível propagá-los por sementes (Carneiro & Dusi, 2002). Essas sementes poderão ser produzidas por muitas gerações sem perder o vigor ou ter

alteração de genótipo (Koltunow et al., 1995). Isso seria importante para a redução dos custos de produção, uma vez que boa parte dos gastos iniciais de cultura refere-se à aquisição de sementes.

Por outro lado, plantas que se propagam vegetativamente, como a batata, podem apresentar contaminações por vírus, viróides e micoplasmas. A introdução da apomixia nessas plantas pode trazer benefícios por poder propiciar propagação através de sementes, gerando material livre de doenças, podendo ser mais facilmente estocados e transportados, e trazendo benefícios como o baixo custo e a alta produção (Spillane et al., 2004). Pela mesma razão, a clonagem por sementes também pode ser de grande interesse no ramo de floricultura (Carneiro et al., 2006).

1.2.2.4. Reprodução em *Brachiaria*

Em *Brachiaria*, a reprodução apomítica ocorre por aposporia (Figura 1), com plantas apresentando saco embrionário do tipo *Panicum*, que são muito comuns em membros da família Poaceae. O endosperma se desenvolve por pseudogamia (Valle, 1991). Em *Brachiaria* a apomixia é predominante, principalmente nas variedades comerciais (Dusi & Willemse, 1999).

Estudos comparativos do desenvolvimento morfológico do gametófito feminino, do acesso sexual e apomítico de *B. brizantha* (Araújo et al., 2000) e *B. decumbens* (Dusi & Willemse, 1999), foram realizados para estabelecimento das diferenças estruturais e cronológicas de marcadores cito-embriológicos do desenvolvimento. A morfologia dos pistilos foi analisada e utilizada para a separação dos ovários em estágios específicos de desenvolvimento em ambas espécies. O momento da diferenciação das iniciais apospóricas foi observado em *B. brizantha* (Araújo et al., 2000) e *B. decumbens* (Dusi & Willemse, 1999). Alves e colaboradores (2001) mostraram a importância da polinização para o desenvolvimento do endosperma em plantas apomíticas de *B. brizantha*, descrevendo os eventos da fertilização e detalhes morfológicos dos primeiros passos da formação da cariopse.

Em plantas sexuais o saco embrionário do tipo *Polygonum*, no lugar das três antípodas encontradas normalmente, podem apresentar um número variável de antípodas, de três a nove (Araújo et al., 2000). Os acessos sexuais de *Brachiaria* são considerados pouco férteis (Valle & Savidan, 1996). Araújo e

colaboradores (2007) observaram que no acesso sexual de *B. brizantha* embora ocorra o desenvolvimento floral e o comportamento reprodutivo normal, a produção de sementes é limitada pelo grande número de sementes abortadas. O aborto dessas sementes pode ser causado pela gradual rejeição das cariopses durante os estágios de desenvolvimento, típico de pressão endogâmica.

1.3. Ploidia em *Brachiaria*

No gênero *Brachiaria* a poliploidia é associada à apomixia, como ocorre geralmente em outros gêneros (Carman, 1997). O número de cromossomos básico do gênero é $X=9$, com predominância de tetraplóides apomíticos ($2n=4X=36$) e os diplóides naturais encontrados em *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruziziensis* são sexuais. As plantas comerciais de maior importância forrageira são tetraplóides (*B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. mutica*) ou hexáploides (*B. humidicola*) e apomíticas (Valle et al., 2004a).

1.4. Melhoramento genético em *Brachiaria*

Uma das limitações nos programas de melhoramento de *Brachiaria* é a diferença de ploidia entre os acessos sexuais e apomíticos (Araujo et al., 2005). Duplicação cromossômica em plantas sexuais diplóides de *B. brizantha* foi obtida após tratamento com colchicina, produzindo plantas tetraplóides (Pinheiro et al., 2000) de modo de reprodução sexual (Araújo et al., 2005), que vêm sendo utilizadas para geração de híbridos intraespecíficos.

A base genética do melhoramento de *Brachiaria* é relativamente estreita. As cultivares de *Brachiaria* que são usadas comercialmente apresentam algumas deficiências. *B. decumbens* cv. Basilik é susceptível à cigarrinha-das-pastagens; *B. brizantha* cv. Marandu é resistente a esse inseto, mas susceptível a *Rhizoctonia* e menos tolerante a solos ácidos e pobres; *B. humidicola* é bem adaptada a solos mal drenados, mas apresenta menor valor nutritivo e apenas tolerância à cigarrinha-das-pastagens. Devido a essas características, o programa de melhoramento visa obter híbridos, por cruzamentos interespecíficos, que reünam características desejáveis como adaptação a solos ácidos, alta produtividade, bom valor nutritivo e resistência à cigarrinha-das-pastagens (Valle et al., 2004).

1.5. Identificação de seqüências de cDNA específicas de ovário

Promotores de expressão específica em ovários de *Brachiaria* são de grande importância em estudos de expressão dos genes envolvidos na apomixia. Podem permitir análises de super-expressão desses genes em tecidos específicos como também o seu silenciamento para estudo de função. A identificação de seqüências de cDNA específicas de ovário pode ser o primeiro passo para a busca de suas regiões promotoras em bibliotecas genômicas.

Em milho (*Zea mays*) o gene *ZmEA1* é exclusivamente expresso em células do aparato da oosfera antes da fertilização. Seqüências homólogas estão presentes em cevada, milheto, arroz e *Tripsacum dactyloides*. Nenhum homólogo foi identificado em *Arabidopsis thaliana* ou em outra espécie de dicotiledônea, indicando ser um possível gene específico de gramínea. O promotor de *ZmEA1* foi isolado, fusionado com o gene *gus* e o gene *gfp* e usado para análises da expressão em plantas transgênicas, onde foram detectados transcritos apenas no aparato da oosfera (Marton et al., 2005).

Em *B. brizantha* Rodrigues e colaboradores (2003) isolaram fragmentos de cDNA que foram diferencialmente expressos em ovários de *B. brizantha* apomítica e sexual, nos estágios de megasporogênese e megagametogênese. Onze clones mostraram perfil de expressão de interesse, sendo nove em acesso apomítico e dois no acesso sexual. A órgão especificidade destas seqüências não foi ainda determinada. No presente trabalho, quatro das seqüências isoladas por Differential Display-RT PCR – DDPCR, de *B. brizantha* apomítica que não apresentaram padrão diferencial de expressão em ovários sexual e apomítico, em experimento anteriores de *northern* reverso, clones 04, 09, 21 e 45 foram selecionadas para determinação da órgão-especificidade.

1.6. Cultura de Tecidos

Para o sucesso na obtenção de plantas geneticamente transformadas um método eficiente de cultura de tecidos que permita a regeneração de plantas é necessário.

Esta regeneração pode se dar por dois mecanismos, por organogênese ou embriogênese, sendo que em ambos há necessidade do estabelecimento de células competentes no explante inicial que possam receber os transgenes e

meios de cultura adequados para o desenvolvimento dos explantes e a obtenção de uma planta transgênica adulta.

Os meios nutritivos para cultura de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*. Os meios se baseiam nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, vitaminas e reguladores de crescimento (Caldas et al., 1998) e possuem em sua composição macronutrientes e micronutrientes, carboidratos, vitaminas e os reguladores de crescimento ou hormônios.

As auxinas e citocininas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas em cultura de tecidos. A formação de raiz, parte aérea e calo em cultura é regulada pela disponibilidade e interação de auxinas e citocininas. Em cultura de calos de tabaco (*Nicotiana tabacum*), meios de cultura contendo um balanço auxina/citocinina favorável à auxina promoveram a formação de raízes, balanços hormonais favoráveis a citocinina induziram a formação de gemas caulinares e balanços intermediários não levaram a uma diferenciação celular e sim à multiplicação das células e crescimento dos calos (Skoog & Miller, 1957; Fosket, 1994). Isso sugere que auxinas e citocininas exercem grande influência no tipo de desenvolvimento exibido pela planta.

Na organogênese a regeneração de raízes ou gemas depende da formação de tecido meristemático que pode ter origem numa célula ou em um grupo de células do calo, ou ainda diretamente do explante. Na embriogênese somática ocorre a formação do embrião a partir de células somáticas sem o envolvimento de gametas e fecundação. Para *Brachiaria* métodos de regeneração por organogênese (Pinheiro et al., 2000) e por embriogênese somática (Tohme et al., 1996) foram desenvolvidos. Alterações nos meios de cultura e concentração dos reguladores de crescimento foram realizadas para maior eficiência no processo de embriogênese em *B. brizantha*. Silveira e colaboradores (2003) testaram a combinação de dois meios de indução de embriogênese somática M1 (2mg/L de 2,4D) e M1.2 (4mg/L de 2,4 D), em combinação com dois meios de regeneração (MS1 e MS2) com diferenças quanto a concentração de ANA e cinetina; tendo sido observada a melhoria do processo de embriogênese somática com o uso do meio M1.2 em combinação com o meio MS2. Santana (2006) e Cabral e colaboradores (2006)

implementaram o uso de novos meios de cultura de indução de embriogênese somática, MSCLind (3mg/L de 2,4D) e de regeneração MSCLreg (BAP, ANA e cinetina) otimizando assim o processo de indução e regeneração de calos embriogênicos e células em suspensão.

A embriogênese somática pode ser natural, quando células dos tecidos embrionários são direcionadas para essa rota de desenvolvimento morfogênético, ou in vitro ou induzida quando células haplóides ou diplóides (somáticas) em diferentes estágios de diferenciação podem, se adequadamente induzidas por estímulos ambientais ou químicos, ser reprogramadas e adquirir novas competências morfogênicas (Guerra et al., 1999). Dois padrões básicos de expressão da embriogênese somática são observados in vitro. O primeiro corresponde ao modelo direto no qual os embriões somáticos se originam dos tecidos matrizes sem a formação de estágios intermediários de calos, e o segundo padrão corresponde ao modelo indireto no qual os embriões somáticos se formam a partir de um tecido intermediário chamado de calo, que apresenta células em diferentes estágios de diferenciação (Sharp, 1980). A grande maioria dos sistemas de embriogênese somática ocorre pela via indireta, onde calos embriogênicos são induzidos e mantidos ao longo da multiplicação.

Na maioria dos sistemas de embriogênese somática induzida in vitro, as auxinas são consideradas as substâncias responsáveis pelo desencadeamento dos processos de dediferenciação, alterando a determinação e conferindo novas competências às células responsivas presentes no explante (Guerra et al., 1999).

O passo principal da embriogênese de plantas é a transição da simetria radial para a simetria bilateral. As duas principais estruturas do embrião, o eixo embrionário e os cotilédones, se diferenciam durante esta mudança de simetria (Fischer et al., 1997). Para investigar o papel das auxinas no estabelecimento da polaridade no embrião de trigo, Fischer e colaboradores (1997) adicionaram inibidores do transporte de auxina aos meios de cultura de embriões, e foi observado que a presença desses inibidores induzia fenótipos anormais durante o desenvolvimento do embrião zigótico e somático, como a formação de vários escutelos fusionados ou ainda em um único escutelo ocorrendo a multiplicação do meristema apical, levando à formação de

poliembriões. Esses resultados indicaram que o transporte polar da auxina tem um papel importante no estabelecimento da simetria do embrião nesta Poaceae. Para análise da distribuição da auxina nos embriões zigóticos de trigo, um análogo de auxina foi utilizado e foi mostrado que a distribuição de auxina é heterogênea e que muda durante o desenvolvimento do embrião. A mudança de simetria no embrião é relacionada com a redistribuição da auxina nos mesmos (Fischer et al., 2001).

Diferentes tipos de auxina podem levar a diferentes respostas dos explantes como observado por Rodriguez e colaboradores (2001) na indução de embriogênese somática em cultura de explantes de bananeira. Foram testadas as auxinas dicamba, picloran, 2,4D e ANA e a resposta embriogenética foi observada somente nos tratamentos com picloran e dicamba. Em *Brachiaria* a auxina mais efetiva na indução de calos foi o 2,4D (Tohme et al., 1996; Silveira et al., 2003; Santana, 2006; Cabral et al., 2006).

A micropropagação ou propagação vegetativa de plantas in vitro é um modo de manter explantes saudáveis e livres de contaminações para aplicação em técnicas de regeneração por cultura de tecidos e transformação genética, além da manutenção de coleções de plantas in vitro. Para estabelecimento de um protocolo de micropropagação vários fatores devem ser considerados e podem ser específicos para cada espécie, como a seleção de explantes adequados, as condições de desinfestação, a concentração de nutrientes e reguladores de crescimento nos meios de cultura, e o enraizamento das partes aéreas (Grattapaglia, 1998; Pati et al., 2006). Nos sistemas de micropropagação a quebra da dominância apical é feita com a aplicação de citocininas exógenas. As gemas axilares são estimuladas a crescer, dando origem a novos brotos, tufos de brotos são formados, os quais são subdivididos e cada broto é isolado dos demais para a formação de novos explantes (Grattapaglia, 1998).

Em *Brachiaria* o sistema de indução, micropropagação e conservação de plantas in vitro foi otimizado por Cabral e colaboradores (2003b), tendo as condições de desinfestação, isolamento do explante e concentração de citocininas avaliados.

Neste trabalho o sistema de micropropagação foi utilizado para estabelecimento de uma coleção de plantas in vitro de *B. brizantha* cv. Marandu apomítica e do acesso sexual, para servir como fonte de explantes

em condições assépticas. Segmentos basais das plantas in vitro foram analisados por microscopia de luz e eletrônica de varredura para avaliar a viabilidade de utilização desses explantes para posterior transformação genética por biobalística.

1.7. Determinação da estrutura do explante

Análises por microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura podem ser realizadas para determinar a estrutura do explante e sua adequação ao processo de transformação.

A morfologia do explante utilizado no bombardeamento de partículas exerce grande influência na obtenção de plantas transgênicas. Para otimização da transformação por biobalística em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), Aragão e Rech (1997) investigaram as características morfológicas dos eixos embrionários e a exposição dos meristemas apicais, por microscopia eletrônica de varredura. A avaliação foi feita em diferentes cultivares da variedade Carioca, e revelou que dos 15 cultivares analisados, sete apresentavam o meristema apical dos eixos embrionários expostos. Entre essas, duas cultivares regeneraram múltiplos brotos da região de meristema, na presença de BAP, mostrando maior aptidão à transformação.

Para análises por microscopia o primeiro passo é a fixação do explante com o fixador adequado para cada técnica, com as seguintes finalidades: evitar a autólise, que é a destruição da célula por suas próprias enzimas; impedir a atividade e proliferação de bactérias; endurecer as células para que elas resistam às etapas seguintes, aumentar a afinidade das estruturas celulares pelos corantes e aumentar o contraste (Junqueira & Carneiro, 1997).

Na análise por microscopia de luz os tecidos devem ser incluídos em parafina ou resinas plásticas especiais, cortadas em micrótomo e coradas com corantes para visualização das estruturas celulares.

O microscópio eletrônico de varredura permite a visualização da superfície de estruturas não seccionadas fornecendo imagens tridimensionais do material intacto. A amostra é fixada, dessecada e revestida com uma camada fina de metal pesado, um feixe de elétrons intenso no interior do microscópio percorre rapidamente a superfície da amostra, resultando na imagem tridimensional (Lodish et al., 2002). As técnicas de microscopia são amplamente utilizadas em

trabalhos de cultura de tecidos para visualização e análise do desenvolvimento de estruturas como na regeneração de calos em Bermudagrass *Cynodon* (Ashok & Rongda, 2000) e distribuição e efeito de reguladores de crescimento durante o desenvolvimento como visto em trigo (Fischer et al., 2001) e *Musa* spp. (Rodriguez et al., 2001).

1.8. Transformação genética

A transformação genética em plantas amplia a possibilidade de obtenção de plantas com características agrônômicas desejáveis, por permitir a transferência de genes, para o genoma de uma planta, independente de haver compatibilidade sexual. Esses genes podem ser provenientes de qualquer outra planta, ou mesmo de animais ou microrganismos (Carneiro et al., 2004). Para possibilitar a introdução e a expressão de genes de um modo eficiente em plantas por técnicas de engenharia genética, vários fatores devem ser considerados, como: métodos de transformação, identificação de promotores e de explantes adequados assim como a eficiência da regeneração desses explantes e um sistema de seleção eficiente das células transformadas.

1.8.1. Métodos de transformação

Uma metodologia amplamente utilizada na transformação genética é o sistema utilizando a *Agrobacterium tumefaciens*, um patógeno natural de plantas que causa a doença galha-da-coroa, que caracteriza-se pela formação de tumores na espécie infectada. A introdução dos genes exógenos na célula vegetal se baseia no processo de infecção pela *Agrobacterium tumefaciens*, onde as linhagens virulentas possuem um plasmídeo Ti que é responsável pela transferência do DNA da bactéria. Esse plasmídeo apresenta uma região conhecida como T-DNA que é transferida para o genoma da célula infectada e codifica os oncogenes que são responsáveis pela indução de tumores. Utilizando-se o sistema natural de infecção, e técnicas de DNA recombinante, os genes de interesse são inseridos na região do T-DNA do plasmídeo Ti (Grasser & Fraley, 1989). Na natureza as dicotiledôneas são mais amplamente infectadas por *Agrobacterium*. Apesar do sistema de transformação via *Agrobacterium* ter sido aplicado com mais eficiência em dicotiledôneas nas décadas de 80 e 90, várias espécies de monocotiledôneas vêm sendo mais

recentemente transformadas com sucesso por esse sistema, como cevada (Tingay et al., 1997; Xue et al., 2003), milho (Gould et al., 1991; Frame et al., 2002), trigo (Hu et al., 2003) arroz (Hiei et al., 1994; Kumar et al., 2005) e sorgo (Zuo-Yu et al., 2000). Em *Brachiaria* foi realizado teste de susceptibilidade a diferentes cepas de *Agrobacterium* spp. com resultados negativos para formação de tumores ou raízes, indicando a não susceptibilidade às cepas testadas. A viabilidade do sistema de transformação via *Agrobacterium*, utilizando três cepas e cinco plasmídeos, incluindo o vetor pTOK demonstrou que o promotor 35SCaMV não é eficiente para promover a expressão do gene *gus* em células de *Brachiaria* de diferentes explantes testados (Cabral et al., 2005). O plasmídeo pTOK vem sendo usado com alta eficiência em monocotiledôneas, e caracteriza-se por possuir um inserto como os genes *virB*, *virC* e *virG* (Hiei et al., 1994).

No método de transformação direta por eletroporação de protoplastos, os protoplastos são colocados em solução juntamente com o DNA de interesse e são submetidos a um pulso elétrico que vai produzir poros na membrana do protoplasto por onde o DNA é introduzido na célula (Thomas & Hall, 1985; Barros & Carneiro, 1998). A principal desvantagem deste método é que a regeneração de plantas a partir dos protoplastos é altamente laboriosa, difícil e pode ser limitante principalmente em monocotiledôneas (Rakoczy-Trojanowska, 2002). A eletroporação de protoplastos tem sido ultimamente mais utilizada na transformação de plastídios (Maliga, 2004). A transformação de protoplastos obtidos de cultura celular é empregada na transformação de espécies lenhosas como macieiras (Ratnasiri et al., 2002), onde esse método combinado com citometria de fluxo oferece rápida seleção das células transformadas.

O método de transformação direta mais amplamente usado é o de biobalística que emprega microprojéteis em alta velocidade para entregar o DNA nas células ou tecidos, descrito primeiramente por Sanford e colaboradores em 1987 (Rech & Aragão, 1998). Esses microprojéteis, feitos geralmente de tungstênio ou ouro devem ser pequenos o suficiente para entrar nas células sem causar danos e de carregar o DNA para o interior dessas células (Sanford, 1990). A eficiência da transformação por biobalística é variável, dependendo da espécie, tecido e estado fisiológico do explante (Sanford, 1990), mas tem sido

utilizado com eficiência tanto para dicotiledôneas como para monocotiledôneas. Cana-de-açúcar (Bower & Birch, 1992), cevada (Ritala et al., 1994), arroz (Christou et al., 1991), trigo (Vasil et al., 1993), sorgo (Casas et al., 1993) e milho (Gordon-Kamm et al., 1990) são exemplos de monocotiledôneas transformadas pelo sistema biobalístico. A otimização dessa técnica depende de vários fatores físicos, como pressão do gás hélio, pressão de vácuo, tipo de partícula a ser utilizada e a distância entre a membrana carreadora e as características do explante (Sanford et al., 1993).

Para plantas de *Brachiaria ruziziensis* uma metodologia de transformação genética via biobalística, utilizando embriões maduros isolados, foi desenvolvida por Lenis (1998) sendo o primeiro relato de transformação. Neste trabalho foram usadas três espécies: *B. decumbens*, *B. ruziziensis* e *B. brizantha* e estabelecidos parâmetros físicos do bombardeamento com o gene repórter *gus*; como a determinação da melhor distância entre a membrana carreadora e a placa alvo (6 cm), pressão do gás hélio (1200 psi) e posição dos embriões em placa de Petri para o bombardeamento; assim como o sistema de seleção e a eficiência de seleção entre os antibióticos canamicina e higromicina. O uso de canamicina na concentração de 100mg/L não afetou o crescimento dos calos, indicando que a canamicina não é um agente de seleção indicado para plantas de *Brachiaria*. A higromicina mostrou ser um bom agente de seleção uma vez que embriões maduros não sobrevivem em concentrações pequenas desse agente, 10mg/L, mostrando alta sensibilidade de *Brachiaria* spp. a esse antibiótico. Plantas de *B. ruziziensis*, sexual diplóide resistentes ao agente seletivo higromicina foram recuperadas e por ensaio de *Sourthen blot* mostraram ser transgênicas.

Questões de biossegurança nos levam a procurar alternativas de seleção diferentemente de genes que conferem resistência a antibióticos, como o gene da manose, que codifica para a enzima PMI (fosfomanose isomerase), que é capaz de converter manose-6-fosfato em frutose-6-fosfato, conferindo à planta a capacidade de usar a manose como fonte alternativa de carbono (Negrotto et al., 2000). Silveira e colaboradores (2003) observaram uma redução de 50% na formação de calos quando a manose estava presente na concentração de 5 g/L combinada com 15 g/L de sacarose. Os calos obtidos não foram capazes de formar embriões somáticos, indicando que a manose não pode ser

catabolizada por *B. brizantha* e que houve um efeito inibitório na embriogênese somática, podendo ser utilizada como agente de seleção como alternativa ao uso de antibióticos ou herbicidas.

1.8.2. Escolha de promotores para a transformação

Promotores que induzem a alta expressão do gene de interesse são fundamentais para a eficiência na transformação de plantas.

Avaliação de diferentes promotores para uso na transformação de *Brachiaria brizantha* foi realizada por Silveira e colaboradores (2003), onde foi testada a eficiência dos promotores Act1 de *Oryza sativa* (McElroy et al., 1990), Act2 de *Arabidopsis thaliana* (Yong-Qiang et al., 1996), Ubi1 de *Zea mays* (Christensen et al., 1992), Ubi3 de *A. thaliana* (Burke et al., 1988), CaMV35S do vírus do mosaico da couve-flor (Guilley et al., 1982) e CVMVp do vírus do mosaico da nervura da mandioca (Verdaguer et al., 1996) baseada na detecção da expressão do gene *gus*. Os melhores resultados foram obtidos com os promotores Act1 e Ubi1, assim como ficou evidenciado a não eficiência do CaMV35S para *Brachiaria*. A partir desses resultados foi construído pelo nosso grupo o vetor pAHUG que contém o promotor do gene de actina I de arroz dirigindo a expressão do gene de seleção *hptII* e o promotor Ubi1 de ubiquitina de milho dirigindo a expressão do gene repórter *gus* (Cabral et al., 2003a).

1.8.3. Genes marcadores

Em metodologias de transformação de plantas, os genes de seleção e genes repórteres são utilizados para identificação de possíveis transformantes. O gene *gus* (Jefferson et al., 1987) que codifica a enzima β -glucuronidase é um gene repórter amplamente utilizado na detecção de plantas transgênicas e em análises de expressão transiente, que é a expressão de um gene exógeno sem necessária integração no genoma da planta hospedeira (Brasileiro & Carneiro, 1998). A expressão de *gus* é considerada apenas como uma evidência de transformação, não sendo suficiente como prova definitiva da integração do gene *gus* no genoma da planta (Potrykus, 1990).

1.8.4. Técnicas moleculares de detecção de genes

A técnica de PCR é amplamente utilizada em análises de plantas transgênicas, pois permite a detecção rápida da presença de genes em DNA genômico, assim como a análise de um grande número de amostras (Gama, 1998). A técnica de *Southern blot* onde é feita a hibridização do DNA genômico com seqüências dos genes introduzidas mostra a integração do gene exógeno no genoma da planta e o número de cópias desse gene no genoma (Romano, 1998). A prova definitiva da transformação estável da planta é fornecida pela análise da segregação do gene na progênie.

1.8.5. Transformação genética em espécies apomíticas

Em plantas apomíticas, a transformação genética é um modo de aumentar a variabilidade genética por meio da introdução de características de interesse agrônomo. Essa tecnologia viabiliza o aporte de qualidades específicas, impossíveis de serem obtidas com as técnicas convencionais de hibridação, e pode ser utilizada para estudos de expressão e regulação de genes responsáveis pela apomixia (Carneiro et al., 2004).

Trabalhos de transformação genética têm sido feitos em espécies apomíticas. Em *Dichanthium annulatum*, uma importante gramínea tropical da Índia, que se reproduz quase que exclusivamente por apomixia facultativa do tipo gametofítica, foi observada a expressão de genes marcadores na progênie das plantas transformadas, indicando que essas plantas são capazes de transmitir o transgene quando se reproduzem por apomixia (Dalton et al., 2003). Em *Paspalum notatum*, importante forrageira com reprodução apomítica do tipo apospórica, plantas resistentes ao herbicida glufosinato com fenótipo e crescimento normal e férteis, foram obtidas após bombardeamento de calos embriogênicos (Smith et al., 2002). Em plantas de *Hieracium piloselloides*, dicotiledôneas com 90% de apomixia do tipo apospórica, trabalhos de transformação mostram que plantas transformadas com o oncogene *rolB* desenvolveram meristemas ectópicos, sofrendo alterações no desenvolvimento do óvulo o que leva a um aumento na iniciação da apomixia (Koltunow et al., 2001). A determinação das relações moleculares entre as vias sexual e apomítica em *Hieracium*, foi realizada com marcadores de desenvolvimento com padrão de expressão conhecido em plantas sexuais. Esses marcadores

foram fusionados ao gene repórter *gus* e as plantas de *H. piloselloides* e *H. aurantiacum* transformadas via *Agrobacterium* (Tucker et al., 2003).

2. OBJETIVOS

Determinar a órgão-especificidade de cDNA de expressão detectada previamente em ovários.

Avaliar diferentes parâmetros da estrutura e cultura de explantes de *Brachiaria brizantha* para otimização da transformação genética por biobalística.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Plantas de *B. brizantha* cv. Marandu apomítica BRA 000591 – B30 e do acesso sexual BRA 002747 – B105 foram cultivadas no campo na Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF e in vitro, em sala de cultura com temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$, sob luz fluorescente ($10\text{-}15 \mu\text{mE}^{-2} \text{s}^{-1}$) em fotoperíodo de 12 horas.

Ovários, folhas e anteras foram coletados das plantas apomíticas para extração de RNA. Os segmentos nodais, das plantas sexuais e apomíticas do campo foram utilizados para micopropagação in vitro. Segmentos basais foram coletados das plantas in vitro, apomíticas e sexuais, para análise estrutural.

As cariopses de *B. brizantha* cv. Marandu BRA 000591 foram cedidas pela Dra. Cacilda do Valle (Embrapa Gado de Corte, Campo grande – MS). Foi usado para os trabalhos de transformação a semente madura já descascada.

3.2. Caracterização da órgão-especificidade de clones de DD-PCR

3.2.1. Extração de ovários e anteras

Os ovários e anteras foram extraídos no estágio de desenvolvimento relativo a megagametogênese, estágio IV, como descrito por Araújo e colaboradores (2000) e excisados dos pistilos sob microscópio estereoscópio Zeiss-Stemi SV11, armazenados em tubos de microcentrifuga em nitrogênio líquido e mantidos em freezer a -80°C . Cada tubo continha 250 ovários ou 250 anteras.

3.2.2. Extração de RNA de ovários e anteras

Em tubo de microcentrifuga contendo 250 ovários ou anteras foram adicionados 250 μL do reagente Trizol[®] (Invitrogen), e os ovários macerados por 30 segundos com pistilo de polietileno com o auxílio de broca AD1-18 s *Bionic Drill set*. Foram adicionados ao macerado 25 μL de uma solução contendo clorofórmio 100% e álcool isoamílico 100% (24:1; v/v). O material foi agitado em agitador de tubos tipo Vortex por 30 segundos e incubado no gelo por 5 minutos. Em seguida o extrato foi centrifugado a 12.000 rpm, em centrífuga Eppendorf 5415C por 15 minutos a 4°C . O sobrenadante foi transferido para tubo novo, onde foi adicionado o mesmo volume de

isopropanol para precipitação do RNA. O material foi incubado a 4°C por 30 minutos e centrifugado a 13.000 rpm, em centrífuga Eppendorf 5417R, por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 500 µL de etanol 70%. Seguiu-se nova centrifugação de 12.000 rpm, em centrífuga Eppendorf 5415C por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o RNA ressuspendido em um volume de 20 µL de água tratada com DEPC (DEPC 0,1%) e autoclavada.

A qualidade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL em tampão TBE 0,5X (5,4 g de Tris, 2,75 g de ácido bórico, e 2 mL de EDTA 500 mM pH 8,0).

3.2.3. Extração de RNA de folhas

RNA foi extraído de folhas jovens de *B.brizantha* coletadas e congeladas em N₂ líquido, pelo método de extração por fenol (Berger, 1987). Cerca de 2 g de tecido foram macerados em cadinho, livre de RNase, com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó bem fino. Ao macerado foram adicionados 6 mL de fenol ácido: clorofórmio: álcool isoamílico, 25:24:1 (v/v/v) e 9 mL de tampão NTES (NaCl 0,1 M, Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, SDS 1%) em tubo de centrífuga. O tubo contendo o macerado foi agitado vigorosamente por 15 minutos à temperatura ambiente e centrifugado a 12.000 rpm, em centrífuga Sorvall® RC-5B DuPont rotor SS34 por 10 minutos. A partir desse ponto, os tubos foram mantidos sempre no gelo. A fase aquosa foi transferida para tubo novo onde foram adicionados 10% do volume de acetato de sódio 3 M pH 4,5 e 2 volumes de etanol absoluto a -20°C. O material foi incubado a -20°C por 2 horas e em seguida centrifugado a 12.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e os tubos mantidos no gelo. O sedimento foi dissolvido em 2,5 mL de água tratada com DEPC gelada, onde foram adicionados 2,5 mL de cloreto de lítio 4 M, e incubado a 4°C durante a noite. Em seguida o material foi centrifugado a 12000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante descartado. O sedimento foi ressuspendido em 1,8 mL de água tratada com DEPC. O RNA foi precipitado em 200 µL de acetato de sódio 3 M e 4 mL de etanol absoluto a -20°C por 1 hora, centrifugado a 12.000 rpm por 20 minutos, e lavado com 5 mL de etanol 70% após descarte do sobrenadante. O RNA foi então centrifugado a

12000 rpm por 3 minutos, o etanol descartado, e ressuspenso em 200 µL de água tratada com DEPC 0,1% gelada.

A qualidade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL em tampão TBE 0,5X (5,4 g de Tris, 2,75 g de ácido bórico, e 2 mL de EDTA 500 mM pH 8,0).

3.2.4. Seleção dos clones

Sequências de cDNA, clones 4, 9, 21 e 45, oriundas de DDPCR (Rodrigues et al 2003) e clonadas no vetor pGEM-T Easy (Promega) estavam armazenadas a -80°C em células de *Escherichia coli*, linhagem XL1Blue em glicerol 15%. Para reativação das bactérias 150 µL desse estoque foram adicionados a 150 µL de meio LB (Tryptona 1%, Extrato de Levedura 0,5%, NaCl 1%) e incubados em banho a 37°C por 30 minutos. Após essa incubação o meio foi colocado sob agitação (190 rpm) a 37°C por 4 horas. Esse pré-inóculo serviu como inóculo da mini-prep para extração do DNA plasmidial. O perfil de digestão do DNA plasmidial foi verificado com a enzima de restrição *EcoRI* (Gibco BRL), que libera o fragmento do vetor, por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL em tampão TBE 0,5X (5,4 g de Tris, 2,75 g de ácido bórico, e 2 mL de EDTA 500 mM pH 8,0).

3.2.5. Preparo das membranas

Foram preparadas 2 membranas de náilon HybondTM-N (Amersham Life Science) com o auxílio de aparelho Bio-Dot[®] Microfiltration Apparatus (BIO-RAD) contendo o DNA, no vetor pGEM-T Easy (Promega), dos clones diferenciais, 03, 04, 09, 11, 13, 14, 19, 21, 32, 41A, 44, 45, 49, 51, 52, 53, 58 e 65A, uma com 100 ng e outra com 250 ng de DNA.

Outras membranas foram preparadas com seqüências de cDNA, dos clones 09, 19, 21, 41A, 44 e 58, amplificadas em reação de PCR com os iniciadores T7 e SP6 à temperatura de anelamento de 47°C. A reação foi feita em um volume final de 50 µL. Destes, 15 µL foram aplicados em três géis de agarose 1%, um para cada sonda, feitas a partir de RNA de anteras, folhas e ovários. Os géis foram transferidos para membranas de náilon HybondTM-N por capilaridade.

As membranas foram incubadas em solução de desnaturação (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) e neutralização (0,5 M Tris pH 7,0, 1,5 M NaCl), tendo o DNA sido fixado por ultravioleta em UV-crosslinker. A pré-hibridização foi feita na temperatura de 45°C, em formamida 50%, SSPE 5x, solução de Denhardt 5X, SDS 0,5%, com 55 µg/mL de DNA de esperma de salmão desnaturado.

3.2.6. Marcação radioativa de sondas

Para confecção das três sondas, RNA total de ovário, folha e antera foram utilizados para síntese de cDNA marcado com [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP.

Para a reação de síntese e marcação do cDNA foram usados 5 µg de RNA total, tampão da RT 1X, dATP 0,5M, dGTP 0,5 mM, dTTP 0,5 mM, dCTP 3,0 µM, Oligo dT 1,0 µM e água tratada com DEPC para volume final de 12,5 µL.

A reação foi agitada gentilmente e aquecida a 65°C por 5 minutos para desnaturação do RNA e resfriada à temperatura ambiente por 15 minutos. Foram adicionados DTT 0,1 M, 5,0 µL de [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP e enzima SuperScript™ II RNase H⁻ RT 250 U (Invitrogen). Após incubação por uma hora em banho-maria a 37°C, a reação foi passada por coluna Probe Quant™ 50 Micro Columns (Amersham Biosciences). A enzima foi inativada por desnaturação a 95°C por 5 minutos e a reação colocada no gelo imediatamente. A sonda foi adicionada à solução de pré-hibridização e a hibridização foi feita por 24 horas. As membranas foram lavadas com SSPE 2X (NaCl 300 mM, NaH₂PO₄.H₂O 20 mM, Na₂EDTA.2H₂O 2 mM) SDS 0,1% por 30 minutos em temperatura ambiente, SSPE 1X, SDS 0,1% 30 minutos a 55°C e SSPE 0,1%, SDS 0,1% a 55°C por 15 minutos, consecutivamente. As membranas foram expostas a filmes de raios-X por 20 dias a -80°C.

3.3. Amplificação dos terminais dos cDNAs por 5' RACE (*Rapid Amplification of cDNA ends*) do clone 21

3.3.1. Purificação de mRNA de ovários de *B. brizantha*

RNA total de ovários do estágio IV foi usado para purificação de mRNA, utilizando o Kit Dynabeads® Oligo (dT)₂₅, seguindo instruções do fabricante Dynal®.

RNA (100 µg em um volume final de 100 µL) foi aquecido a 65°C por 2 minutos e foram adicionados 200 µL de suspensão de *Dynabeads*[®] previamente lavada com tampão de ligação 2X e mantido por 5 minutos à temperatura ambiente invertendo o tubo vagarosamente. A solução contendo o RNA foi colocada no MPC (concentrador magnético de partículas - Dynal[®]) por 30 segundos, até a solução ficar clara. O sobrenadante foi retirado e os *beads* foram lavados com 220 µL de tampão de lavagem B. O tubo foi colocado novamente no MPC e o sobrenadante retirado. Esse passo foi repetido mais uma vez. Após as lavagens, o RNA foi eluído em 6 µL de Tris-HCl pH 7.5 livre de RNase e aquecido a 80°C por 2 minutos e o tubo foi colocado imediatamente no MPC por 30 segundos para coletar o sobrenadante, que contém o mRNA que foi armazenado a -80°C.

3.3.2. Síntese da primeira fita de cDNA

cDNA foi sintetizado utilizando o *Marathon*[™] *cDNA Amplification Kit*. Em um tubo foram adicionados 3 µL (~ 2 µg) de mRNA, 1 µL de iniciador para síntese de cDNA (CDS – 10 µM) e água estéril para completar o volume de 6 µL, que foi centrifugado rapidamente e incubado a 70°C por 2 minutos, e em seguida colocado no gelo por 2 minutos. Após a incubação no gelo foram adicionados: 2 µL de tampão para a primeira fita 5X, 1 µL de dNTPmix (10 mM), e 1 µL (20 U) da enzima AMV transcriptase reversa e o volume completado para 10 µL com água. A reação foi misturada usando pipeta, centrifugada rapidamente e incubada a 42°C por 1 hora e colocada no gelo para parar a reação.

3.3.3. Síntese da segunda fita de cDNA

Foram usados 10 µL da reação da primeira fita de cDNA aos quais foram adicionados 16 µL de tampão para a segunda fita 5X, 1,6 µL de dNTPmix (10 mM), 4 µL do coquetel da enzima para a síntese da segunda fita 20X e água estéril para completar o volume de 50 µL. Essa reação foi misturada com pipeta, centrifugada rapidamente (*spin*) em centrífuga Eppendorf 5415C, e incubada a 16°C por 1 hora e meia. Após a incubação foram adicionados 2 µL (10U) da enzima T4 DNA polimerase seguido de uma nova incubação a 16°C por 45 minutos. Foram adicionados 4 µL de uma solução de EDTA/ glicogênio para parar a reação.

Para limpeza do cDNA foram adicionados 100 µL de água e 200 µL de solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1, v/v/v), o tubo foi agitado vigorosamente em agitador de tubos tipo Vortex e centrifugado a 14.000 rpm (centrífuga Eppendorf 5415C) por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para tubo novo onde foram adicionados 200 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v/v), agitado e centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos, e a fase aquosa transferida para tubo novo. Para precipitação do cDNA foram adicionados 75 µL (0,5 v) de acetato de amônio 4 M e 375 µL (2,5 v) de etanol diluído a 95%. O tubo foi agitado vigorosamente e centrifugado a 14.000 rpm por 20 minutos, o sobrenadante foi removido e o DNA lavado com 300 µL de etanol 80% e centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos. O DNA foi ressuspenso em 10 µL de água bidestilada estéril.

A análise da qualidade e tamanho do cDNA foi feita por eletroforese em gel de agarose 1,2%, corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) em tampão TBE 0,5X (5,4 g de Tris, 2,75 g de ácido bórico, e 2 mL de EDTA 500 mM pH 8,0).

3.3.4. Ligação dos adaptadores ao cDNA

Foram usados 5 µL da reação de síntese da segunda fita de cDNA aos quais foram adicionados 2 µL do adaptador *Marathon cDNA* (10 µM), 2 µL do tampão de ligação 5X e 1 µL (400U) da enzima T4 DNA ligase. A reação foi incubada a 16°C durante a noite. Após incubação a enzima foi inativada a 70°C por 5 minutos. O cDNA ligado ao adaptador foi diluído para 0,4 ng/ µL em tampão tricina-EDTA (fornecido pelo *Marathon™ cDNA Amplification Kit*) estocados a -20°C.

3.3.5. Desenho dos iniciadores

Para amplificação do terminal 5' da seqüência do clone 21 por 5'RACE foram desenhados iniciadores como apresentado na Figura 2. Os iniciadores foram desenhados no sentido anti-senso utilizando o programa PRIMER, seguindo as informações fornecidas pelo *Marathon™ cDNA Amplification Kit* - Invitrogen.

CL 21 (56)	5'- ATGGTCGTTGGGTCGAGGGGTCTT-3'
CL 21 (114)	5'- CATCTTTCGGCGCTGCCTCTTCAG-3'
AP1	5'- CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3'

Figura 2 - Seqüência dos iniciadores utilizados para amplificação por 5'RACE do clone 21. AP1: iniciador do adaptador do Kit de 5'RACE.

3.3.6. Reação de 5' RACE – *Rapid Amplification of cDNA Ends*

O cDNA com os adaptadores foi diluído para a concentração de 0,1 ng/μL em tampão tricina/EDTA, desnaturado por 2 minutos a 95°C e colocado imediatamente no gelo por 2 minutos.

Foi feita uma solução com 5 μL do tampão Advantage 2 10X, 1 μL de dNTPmix (10 mM) e 1 μL da enzima Advantage 2 Polimerase 50X, 5 μL (0,5 ng) de cDNA de ovário de *B. brizantha* estágio IV, 1 μL do iniciador AP1 e 1 μL do iniciador gene específico (CL21 114) e água para completar o volume para 50 μL.

O programa utilizado para o 5'RACE foi: 1 minuto a 94°C; 4 ciclos de 30 segundos a 94°C e 4 minutos a 72°C; 4 ciclos de 30 segundos a 94°C e 4 minutos a 70°C; 34 ciclos de 20 segundos a 94°C e 4 minutos a 68°C, em termociclador PTC-100™ (MJ Research, Inc.)

O produto da reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio (0,5 μg/mL) em tampão TBE 0,5X (5,4 g de Tris, 2,75 g de ácido bórico, e 2 mL de EDTA 500 mM pH 8,0).

Para análise dos produtos de amplificação foi feita PCR com um iniciador mais interno – CL21 56 - com temperaturas de anelamento de 55°, 60° e 64°C.

As bandas amplificadas foram excisadas e eluídas do gel utilizando o *Kit QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol* – QIAGEN, e clonadas no vetor pCR® 2.1 (Invitrogen) conforme orientação do fabricante. O produto da transformação em células XL1 Blue de *E. coli* foi plaqueado em 20 mL de meio sólido LB com ampicilina. As colônias brancas foram selecionadas e crescidas em 3 mL de meio LB líquido com ampicilina 100 mg/L para mini-preparação de DNA plasmidial.

3.3.7. Preparo de células competentes para transformação por eletroporação

Uma cultura de *E. coli XL 1 Blue* (Clontech®) foi plaqueada em LB sólido e incubada em estufa a 37°C por 16 horas. A partir de uma colônia isolada, crescida em placa de Petri, foi feito um pré inoculo em tubo cônico de 15 mL tipo Falcon™, contendo 5 mL de meio LB. A cultura foi incubada por cerca de 16 horas sob agitação vigorosa, a 37°C.

Um volume correspondente a 1/100 do pré inoculo foi inoculado em 1L de meio L (bactotripton 1%, Extrato de Levedura 0,5%, NaCl 0,5%) e incubado sob agitação vigorosa, a 37°C até atingir A_{600} de 0,6. Após atingir a A_{600} desejada, a cultura foi mantida no gelo por 30 minutos e centrifugada a 4.000 rpm, em centrífuga Sorvall® RC-5B DuPont® rotor GSA, por 15 minutos, a 4°C. As bactérias foram ressuspensas em 500 mL de água bidestilada estéril e centrifugadas a 4.000 rpm por 15 minutos, a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e as células foram ressuspensas em 20 mL de solução de glicerol 10% (v/v). Após centrifugação a 4.000 rpm por 15 minutos a 4°C, as células foram ressuspensas em 2 mL de glicerol 10% estéril. O material foi dividido em alíquotas de 40 µL e estocado a -80°C.

3.3.8. Transformação por eletroporação, das ligações das bandas resultantes do 5'RACE do clone 21 clonadas no vetor pCR® 2.1 (Invitrogen)

Foram adicionados 2 µL da reação de ligação ao estoque de 40 µL de células competentes de *E. coli XL 1 Blue* (Clontech®). A mistura foi colocada em cuveta de eletroporação BioRad de 0,2 cm de distância entre os eletrodos.

As células foram eletroporadas em eletroporador BioRad sob as seguintes condições: 200 Ω de resistência, 25 µF de capacitância e voltagem de 25 kV.

Após a eletroporação, foi adicionado 1 mL de meio LB ao transformado e essa cultura foi incubada a 37°C por uma hora sob agitação vigorosa (180 rpm).

O volume total de cultura, cerca de 100 µL foi plaqueado em meio LB sólido, contendo 100 mg/L de ampicilina, 20 µg/mL de X-gal e 0,16 mM de IPTG.

As colônias brancas foram selecionadas e crescidas em 3 mL de meio LB líquido com ampicilina 100 mg/L para mini-preparação de DNA plasmidial.

3.3.9. Mini-preparação de DNA plasmidial

As culturas de bactérias transformadas com os clones (3 mL) em estudo foram centrifugadas a 12.000 rpm, em centrífuga Eppendorf 5415C, por 1 minuto. O sedimento foi ressuscitado em 100 µL de solução I (Glicose 50 mM, Tris 25 mM, EDTA 10 mM) com 2 µL de RNase A (10 mg/mL) e 200 µL da solução II (NaOH 0,2 M, SDS 1%) foram adicionadas. As amostras foram misturadas por inversão e colocadas no gelo. Em seguida foram adicionados 150 µL da solução III (acetato de potássio 5 M, ácido acético glacial), agitada lentamente e incubada no gelo por 5 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 5 minutos e a fase aquosa transferida para tubo novo onde foram precipitadas com 2 volumes de etanol 100%, mantidas por 2 minutos a temperatura ambiente e centrifugadas a 12.000 rpm por 2 minutos. O sedimento foi lavado com etanol 70% e centrifugado por 2 minutos. O DNA plasmidial foi ressuscitado em 30 µL de água bidestilada estéril.

O DNA plasmidial foi digerido com a enzima *EcoRI* (Gibco BRL) para verificação do tamanho dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) em tampão TBE 0,5X (5,4 g de Tris, 2,75 g de ácido bórico, e 2 mL de EDTA 500 mM pH 8,0).

3.3.10. Sequenciamento de DNA

Os clones foram quantificados e enviados para sequenciamento na Plataforma Genômica da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia ou na Universidade Católica de Brasília na concentração de 100 ng/µL. Na reação de sequenciamento foram utilizados os iniciadores M13 forward e M13 reverso na concentração de 3,2 pmoles cada e 2 µL de mix do Big Dye 3.1Kit (Applied Biosystems). A leitura das amostras foi feita em sequenciador ABI 3700 (Applied Biosystems).

3.3.11. Análise das seqüências

A análise das seqüências geradas no seqüenciador ABI3700 foi feita no endereço eletrônico <http://adenina.biomol.unb.br/phph>, utilizando o programa Electropherogram quality analysis (Togawa & Brigido, 2003). O programa PHRED (Ewing et al., 1998) foi utilizado para analisar a qualidade dos cromatogramas gerados no seqüenciador. O programa CROSSMATCH foi

usado para remover a seqüência do vetor pCR[®] 2.1 e dos adaptadores do Kit de 5' RACE. Para o agrupamento de seqüências semelhantes (clusterização), foi utilizado o programa CAP3. Esse programa estabelece um *contig*, que é uma seqüência consenso, derivada da junção de duas ou mais seqüências relacionadas, por múltiplos alinhamentos.

Para análise de similaridade foi utilizado o programa BLASTN contra o banco nr (não redundante) de nucleotídeos do NCBI (www.ncbi.nlm.gov/BLAST) (Altschul et al., 1997).

3.4. Parâmetros de biobalística usados para transformação genética de diferentes explantes

3.4.1. Precipitação do DNA sobre as micropartículas de Tungstênio

Para a precipitação do DNA sobre as micropartículas de Tungstênio a umidade relativa do ar deve estar em no máximo 50%.

Partículas de Tungstênio M10 foram sonicadas por 5 minutos e mantidas sob agitação em agitador tipo Vortex por 10 minutos. Em cada tubo de microcentrífuga do tipo Eppendorf foram adicionados nesta ordem: 50 µL (60 mg/mL) de partículas, 8 ou 10 µg (1 µg/µL) de DNA plasmidial, 50 µL de CaCl₂ 2,5 M e 20 µL de espermidina 0,1 M, sempre sob agitação. Os tubos foram submetidos à agitação por dez minutos e centrifugados a 12.000 rpm, em centrífuga Eppendorf 5415C, por dez segundos, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 150 µL de etanol absoluto para suspender as partículas. Esta etapa de lavagem foi repetida duas vezes. Por fim, as partículas foram ressuspensas em 24 µL de etanol absoluto, colocadas em sonicador Branson B1210E-MTH, para desaglomeração por 1 a 2 segundos, e em cada membrana carreadora foram aplicados 3,2 µL, espalhados uniformemente na área central das membranas. As membranas carreadoras foram deixadas no dessecador com sílica gel por pelo menos dez minutos antes do bombardeamento, para total evaporação do etanol.

3.4.2. Vetores

Em diferentes experimentos de transformação genética por biobalística foram utilizados os vetores pAct1-D (McElroy et al., 1990), pAHC27 (Christensen & Quail, 1996) e pAHUG (Cabral et al., 2003a), conforme descrito na figura 3.

Esses vetores possuem promotores de monocotiledôneas dirigindo a expressão do gene repórter *gus* (Jefferson et al., 1987) ou do gene de seleção *hptII*.

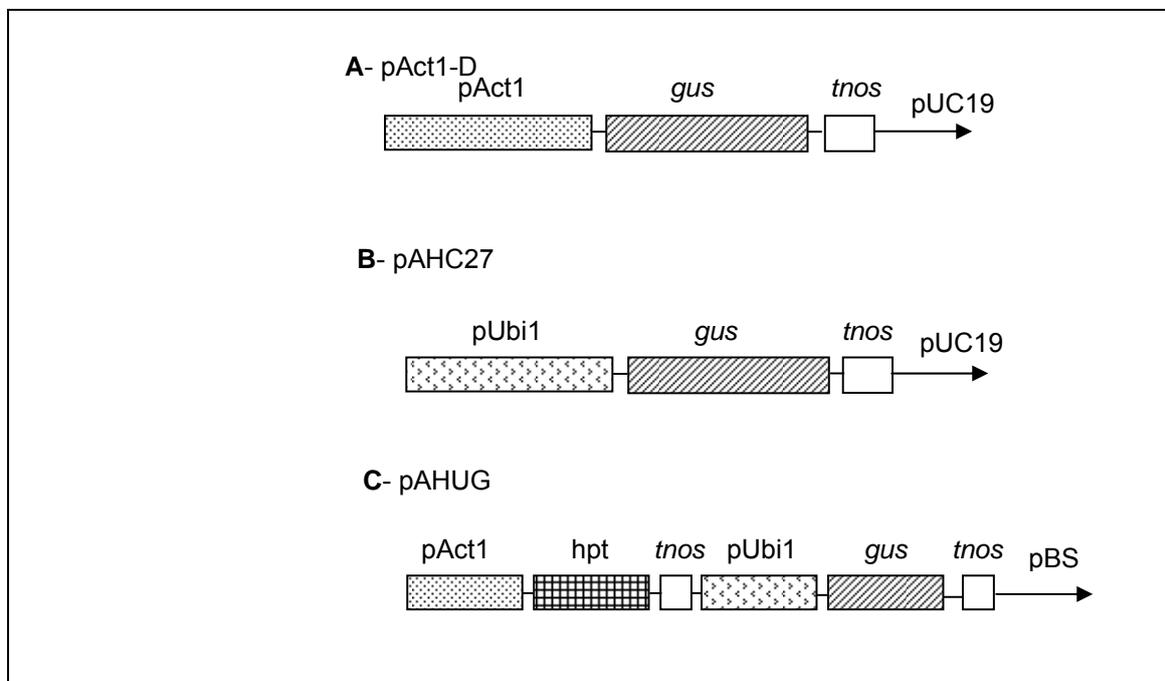


Figura 3 - Representação esquemática dos plasmídeos utilizados para transformação genética de *B. brizantha*. **A** - pAct1-D - promotor Act1 de actina de arroz dirigindo a expressão do gene *gus* e terminador *nos* (McElroy et al., 1990), **B** - pAHC27 promotor Ubi1 da ubiquitina de milho dirigindo a expressão do gene *gus* e terminador *nos* (Christensen & Quail, 1996), **C** - pAHUG - promotor Act1 de actina de arroz dirigindo a expressão do gene de seleção *hptII* e terminador *nos* e promotor Ubi1 da ubiquitina de milho dirigindo a expressão do gene *gus* e terminador *nos* (Cabral et al., 2003a).

3.4.3. Condições de bombardeamento

Os experimentos de biobalística foram realizados com: 8 ou 10 µg de DNA plasmidial, pressão do gás hélio de 900 psi, distância entre o explante e a membrana carreadora de 6 cm e 25 lbs de vácuo.

3.4.4. Análise histoquímica do gene *gus*

Para verificação do nível de expressão do gene *gus* em diferentes tecidos, 24 ou 48 horas após o bombardeamento, embriões isolados, calos e suspensão

de células foram incubados em uma solução de X-Gluc ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 100 mM, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,5 mM, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mM, Triton[®] X-100 0,1%, X-Gluc 50 mg/mL 1 mM) por 16 horas a 37°C (Jefferson et al., 1987). O resultado foi observado observando-se os tecidos em microscópio estereoscópio Zeiss-Stemi SV11.

3.5. Análise do potencial de diferentes explantes de *B. brizantha* para transformação genética

3.5.1. Explantes analisados

Para identificação do explante mais adequado para transformação genética via biobalística foram avaliados quatro tipos de explantes: 1. segmentos basais - base estolonífera de plantas cultivadas in vitro; 2. embriões isolados de sementes maduras; 3. calos embriogênicos; 4. células em suspensão.

3.5.1.1. Introdução, manutenção e micropropagação in vitro

Visando o estabelecimento de uma coleção de plantas in vitro, segmentos nodais de plantas, apomítica e sexual, cultivadas no campo da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia foram coletados e levados ao laboratório onde foram excisados do colmo de modo que as gemas ficassem expostas. Os segmentos nodais foram posteriormente cortados no sentido longitudinal para expor os vasos e facilitar a desinfestação dos explantes, tendo sido submetidos primeiramente a álcool 70% por 3 minutos, para quebrar a tensão superficial, e depois, ao hipoclorito de sódio 5% por 20 minutos, sendo lavados, em seguida, três vezes em água destilada esterilizada.

Após a desinfestação superficial, 12 segmentos nodais foram inoculados por placa em meio LS (Tabela 1) suplementado com cinetina 3 mg/L ou 6 mg/L para induzir a multibrotação. Quando os brotos alcançaram cerca de 1 cm, foram individualizados e transferidos para tubos de ensaio contendo meio B sem regulador de crescimento (Tabela 1) ou MMP - meio de manutenção de plantas (Tabela 1), até o desenvolvimento de plântulas.

A base estolonífera das monocotiledôneas – região logo acima das raízes - é a região meristemática das plantas cultivadas in vitro, aqui denominada de segmento basal. Esses segmentos basais foram inoculados em meio LS

(Tabela 1) para manutenção da coleção, micropropagação e análise estrutural por microscopia de luz e eletrônica de varredura.

3.5.1.2. Meios de Cultura utilizados

Os meios de cultura apresentados na Tabela 1 foram utilizados em diferentes etapas de um ciclo de cultivo, ou foram comparados entre si para determinação de um meio de cultivo mais adequado para *B. brizantha*.

Tabela 1: Meios de cultura utilizados nos trabalhos de cultura de tecidos

Reagentes	M1	M1.2	MS1	MS2	MSCL Ind	MSCL reg	MMP	LS	B Mod.	DDI
Macronutrientes	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS 1/2	MS	MS	MS 1/2
Micronutrientes	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS 1/2	MS	MS	MS
Vitaminas	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Caseína hidrolisada	100 mg/L	100 mg/L	-----	-----	300 mg/L	300 mg/L	100 mg/L	100 mg/L	-----	-----
BAP	0,2 mg/L	0,2 mg/L	-----	-----	0,2 mg/L	1 mg/L	-----	3 mg/L	-----	----
2,4 D	2 mg/L	4 mg/L	-----	-----	3 mg/L	-----	-----	-----	-----	1,1 mg/L
ANA	-----	-----	0,1 mg/L	-----	-----	0,5 mg/L	0,2 mg/L	1 mg/L	-----	-----
Cinetina	-----	-----	0,4 mg/L	4mg/L	-----	2,5 mg/L	0,5 mg/L	3 mg/L	-----	-----
Tiamina	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	100 mg/L	-----	-----
Zeatina	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0,2 mg/L
Ácido ascórbico	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	10 mg/L
GA ₃	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0,2 mg/L	-----	-----	-----
Inositol	-----	-----	100 mg/L	100mg /L	-----	100 mg/L	100 mg/L	100 mg/L	-----	-----
Sacarose	3 %	3 %	3 %	3 %	3 %	3 %	2 %	3 %	3 %	3 %
Ágar	0,7 %	0,7 %	0,7 %	0,7 %	0,7 %	0,7 %	0,7 %	0,7 %	0,7 %	-----

MS (Murashige&Skoog, 1962); MSCLind e MSCLreg (Garg et al., 2002); LS (Linsmaier&Skoog, 1965); B (Bourgin et al., 1979); DDI (Matsumoto, 2006).

mod: modificado

3.5.1.3. Análise estrutural de segmentos basais de plantas cultivadas in vitro

Plantas de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu apomítica e acesso sexual, com tamanho de 5-7 cm, cultivadas in vitro foram selecionadas para análise.

O segmento basal foi cortado transversalmente num segmento de 1 cm, tendo sido subdividido em 3 partes: corte basal, mediano e apical (Figura 4). Os cortes foram cultivados em meio LS – micropropagação - sendo 5 cortes em cada pote de vidro tipo *baby food*, numa amostragem de 15 explantes para cada tipo de corte. As amostras foram mantidas em sala de cultura com temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$, sob luz fluorescente ($10\text{-}15 \mu\text{E}^{-2} \text{s}^{-1}$) em fotoperíodo de 12 horas.

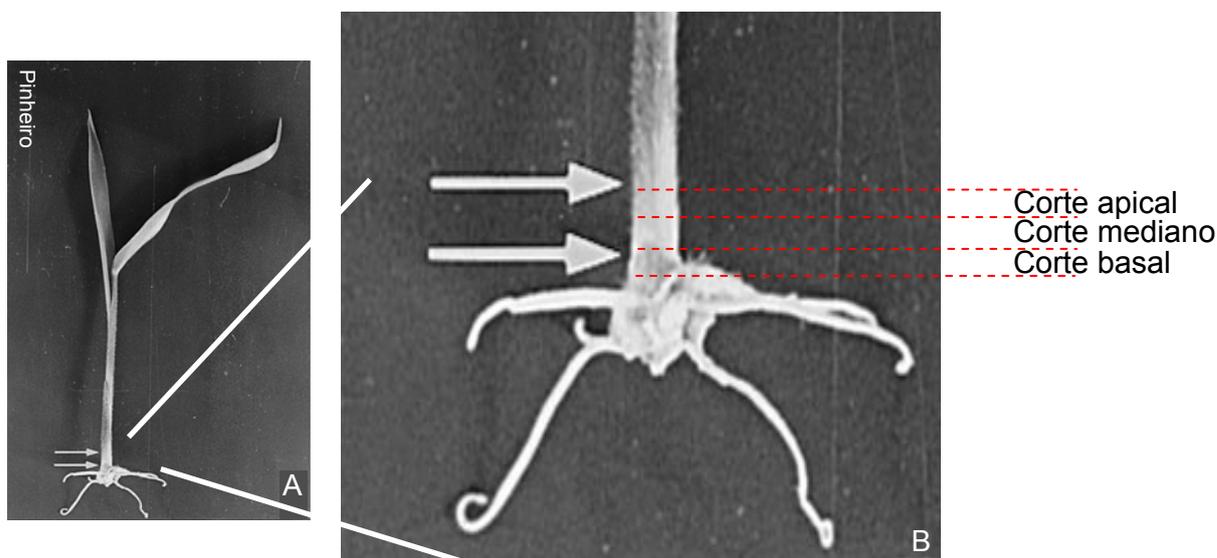


Figura 4 - A - Planta de *Brachiaria brizantha* cultivada in vitro (Pinheiro et al, 2000). As setas indicam o segmento basal. **B** - Esquema dos cortes apical, mediano e basal feitos nos segmentos basais da plantas cultivadas in vitro.

Quatro explantes de cada tratamento foram fixados, dois em cada tipo de fixador para preparo e visualização por microscopia de luz ou microscopia eletrônica de varredura em diferentes dias de cultivo 0, 7 e 14 dias, como descrito a seguir.

3.5.1.3.1. Microscopia de Luz

Os explantes foram fixados em solução de FAA contendo formol 40%, ácido acético e álcool 70%, 1:1:18 v/v, e submetidos ao vácuo por 1 hora. Após esta etapa ficaram no fixador por 48 horas a 4°C. O material foi desidratado em uma série crescente de etanol 70% e 90% por 30 minutos cada, e de 100% por duas vezes de 30 minutos. Em seguida foi adicionado xilol puro, com três trocas de 30 minutos cada. Na última passagem pelo xilol, pastilhas de Paraplast® foram aos poucos sendo adicionadas à solução em temperatura ambiente. Quando as pastilhas não estavam mais derretendo no xilol. Posteriormente os tubos foram incubados a 65°C. A partir desse ponto foi usada parafina líquida para as demais trocas. Três vezes ao dia, metade do volume da solução xilol/paraplast foi retirada e o volume completado com parafina líquida. No segundo dia o tubo ficou aberto para que o resto de xilol evaporasse ficando só a parafina. Com parafina pura, foram feitas mais duas trocas. As amostras foram preparadas em formas de alumínio com auxílio de placa aquecedora a 55°C, e colocadas para polimerizar em superfície fria por 24 horas. Para desemblocar o material, as formas foram colocadas a -20°C por 5 minutos. O material foi montado em blocos de madeira e deixados por 24 horas para fixar a parafina nos blocos.

3.5.1.3.2. Preparo das lâminas

As lâminas de vidro para microscopia foram recobertas com solução de 2% de TESP (3-trietaxilano – aminopropil) em etanol. O material embocado foi cortado em micrótomo rotativo manual Leits 1512 na espessura de 8 µm. O banho-maria foi ajustado em 42°C para que os cortes incluídos em parafina ficassem esticados nas lâminas sobre uma fina camada de água. As lâminas depois de secas foram guardadas a 4°C até serem deparafinadas.

As lâminas com os cortes foram deparafinadas com xilol em três trocas por 35 minutos e depois foram colocadas em solução de xilol: etanol (1:1) por 15 minutos, seguido de uma série decrescente de etanol, 100%, 90% e 70% por dez minutos cada, e 50% e 30% por 5 minutos. Após hidratação, os cortes foram molhados rapidamente em água destilada. A coloração foi feita com safranina 1% (aquosa) por 40 minutos, seguida de lavagem rápida com água para tirar o excesso de corante. Foi feita a desidratação com passagens rápidas em séries

crescentes de etanol 30%, 50%, 70%, 95%, para a coloração com fast green 1% (alcóolico 95%) por 1 minuto. O material foi passado rapidamente por etanol 95% e 100%, depois em solução de xilol:etanol (1:1) e apenas xilol. Depois de secas em fluxo de capela de exaustão, as lâminas foram montadas com Permount®.

A visualização dos cortes foi feita em Microscópio Zeiss – Axiophot.

Para análise da suspensão celular foram colocadas duas gotas da suspensão na lâmina, para coloração foi adicionada uma gota de carmim acético 0,4% (em ácido acético 45%), as amostras foram analisadas imediatamente e fotografadas.

3.5.1.3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura

Os explantes dos segmentos basais foram fixados em paraformaldeído 4%, glutaraldeído 2% e cacodilato de sódio 0,05M e colocados sob vácuo por uma hora. Após a fixação, o material foi lavado com tampão cacodilato pH 7.2 0,05 M - dez minutos, duas vezes - seguido de uma pós fixação em tetróxido de ósmio 2% por duas horas no escuro, e lavagem com água bidestilada por dez minutos, por duas vezes. O material foi desidratado em série crescente de etanol, por 20 minutos cada: 10%, 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, sendo por duas vezes em etanol 90% e 100%.

Após a desidratação foi feita a secagem ao ponto crítico e montagem nos discos metálicos - porta espécime – com o uso de fita de carbono, seguido da metalização em ouro e da observação no microscópio eletrônico de varredura Zeiss DSM 962.

3.5.1.4. Embriões isolados de sementes maduras:

3.5.1.4.1. Desinfestação das sementes

Sementes maduras foram desinfestadas em etanol 70% por 3 minutos, hipoclorito de sódio 5% contendo Tween 20 2,5% por 25 minutos e lavadas três vezes em água destilada esterilizada.

Nos experimentos onde embriões isolados foram utilizados; após a desinfestação das sementes os embriões foram excisados sob microscópio estereoscópio Zeiss-Stemi SV11 em capela de fluxo laminar e posicionados em placa de Petri contendo meio de indução de embriogênese somática M1 ou M1.2, diferentes quanto a concentração de 2,4D (2 ou 4 mg/L).

3.5.1.4.2. Efeito do período de indução de embriogênese somática anterior ao bombardeamento

Para avaliação do efeito do período de indução de embriogênese somática anterior ao bombardeamento, os embriões foram excisados e submetidos a períodos de cultura de um, três, cinco ou sete dias em meio de indução de embriogênese somática M1.2 (Tabela 1). Após os respectivos dias de cultura os embriões foram bombardeados com o plasmídeo pAct1-D (McElroy et al., 1990). Foram analisados, por teste histoquímico, 75 embriões por tratamento, 24 horas após serem bombardeados.

3.5.1.4.3. Estabilidade do gene *gus* em embriões bombardeados

Para análise da estabilidade do gene *gus* em embriões bombardeados, foram avaliados 650 embriões. Os embriões foram bombardeados após um ou três dias em meio de indução de embriogênese somática M1 ou M1.2 (Tabela 1), sendo duas repetições para cada experimento. Os embriões foram bombardeados com o plasmídeo pAct1-D e após 24 horas, 40 embriões (20 de cada meio) foram submetidos a ensaio histoquímico para o gene *gus*.

Os demais explantes foram mantidos no escuro em meio de indução de embriogênese somática e após 10 e 20 dias foram retirados dez embriões de cada meio e submetidos ao teste histoquímico. Após 30 dias em meio de indução M1 ou M1.2 os explantes restantes foram transferidos para meio de regeneração MS1 ou MS2 (Tabela 1), respectivamente, e foram cultivados por 30 dias em sala de cultura com temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$, sob luz fluorescente ($10\text{-}15 \mu\text{mE}^{-2} \text{s}^{-1}$), em um fotoperíodo de 12 horas.

3.5.1.5. Obtenção de calos embriogênicos para transformação genética

Sementes maduras foram plaqueadas após desinfestação em meio de indução de embriogênese somática, MSCLind (Tabela 1) pH 5.8, e mantidas no escuro por 30 dias em sala de cultura com temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Os calos obtidos foram utilizados para experimentos de biobalística.

3.5.1.5.1. Comparação entre bombardeamento de embriões e calos embriogênicos

Embriões (276) com cinco dias em meio de MSCLind (Tabela 1) e calos embriogênicos (183) cultivados por quatro dias em meio MSCLind com Phytigel® 0,7% (meio de bombardeamento) foram bombardeados com 8 µg de plasmídeo pAct1-D, pAHC 27 ou pAHUG. Dois dias após o bombardeamento alguns explantes foram separados para teste histoquímico do gene *gus*. Os embriões bombardeados com pAct1-D ou pAHC 27 foram transferidos para meio MSCLind, enquanto os calos foram para meio de regeneração MSCLreg. Os embriões e calos bombardeados com pAHUG foram transferidos para 5mg/L de higromicina em MSCLind e MSCLreg, respectivamente.

3.5.1.5.1.1. Extração de DNA de folha para PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

A detecção do gene *gus* foi feita por PCR com oito plantas, oriundas do bombardeamento com o plasmídeo pAct1-D, de onde foi retirada amostra de pelo menos duas áreas.

Uma amostra de 2 cm de folha da planta, dos brotos regenerados, foi retirado e macerado com bastão de vidro em 400 µL de tampão de extração (Tris-HCl pH 8.0 0,1 M; NaCl 0,25 M; EDTA 0,025 M e SDS 0,5%). O material foi misturado em agitador tipo Vortex e foi adicionado 1 volume de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico - 25:24:1, v/v/v e após centrifugação a 12.000 rpm, em centrífuga Eppendorf 5415C, por 5 minutos a fase aquosa foi transferida para tubo novo onde foi adicionado 1 volume de clorofórmio: álcool isoamílico - 24:1, v/v. O material foi centrifugado a 12000 rpm por 5 minutos e a fase aquosa transferida para tubo novo onde foi adicionado o mesmo volume de isopropanol, seguida de incubação por 2 horas. Após este período o material foi centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e após secar, o DNA foi ressuscitado em 20 µL de água.

Para a PCR foram usados 120 ng DNA, tampão da Taq 1X, dNTPs 0,13 mM, iniciadores para o gene *gus*, GUS F - CTA CAC CAC GCC GAA CAC CT e GUS R - CAG GCA CAG CAC ATC AAA GA 0,2 µM, 0,2 U de Taq e água bidestilada para volume final de 25 µL. O programa utilizado foi: 5 minutos a 95° C; 35 ciclos

de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 55°C, 1 minuto a 73°C, seguido de 7 minutos a 73°C;; em termociclador PTC-100™ (MJ Research, Inc.)

O produto da reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) em tampão TBE 0,5X (5,4 g de Tris, 2,75 g de ácido bórico, e 2 mL de EDTA 500 mM pH 8,0).

3.5.1.5.2. Efeito do período de indução de calos embriogênicos para bombardeamento

Para transformação utilizando calos embriogênicos várias condições foram testadas em quatro experimentos: I. Calos com 20, 25 ou 30 dias em meio MSCLind (Tabela 1); II. 2, 3 ou 4 dias em meio bombardeamento anterior à transformação, III. transferência para meio MSCLreg (Tabela 1) e análise histoquímica 48 horas após o bombardeamento, IV. concentrações iniciais de higromicina para seleção de 5mg/L e 10mg/L. O plasmídeo usado foi o pAHUG.

3.5.1.5.3. Efeito do tratamento osmótico no bombardeamento e da seleção dos transformantes em altas doses de higromicina

Calos de 15 dias em meio MSCLind (Tabela 1), com aproximadamente 5 mm de diâmetro, foram mantidos em meio de bombardeamento com sacarose 12% por 16 horas antes do bombardeamento com o plasmídeo pAHUG. Vinte e quatro horas após o bombardeamento, um calo de cada placa foi transferido para teste histoquímico do gene *gus*, enquanto os demais explantes foram transferidos para meio MSCLind (Tabela 1) com 15 mg/L ou 30 mg/L de higromicina por 15 dias. Após esse período, os explantes foram transferidos para meio MSCLReg (Tabela 1) nas mesmas concentrações de higromicina e os brotos regenerados foram transferidos para meio MMP - de manutenção de plantas -(Tabela 1).

3.5.1.6. Obtenção de suspensão celular

Aproximadamente um grama de calos obtidos de sementes maduras em meio MSCLind pH 5.8 ou pH 4.0 foram inoculados no mesmo meio líquido em pH 5.8 ou pH 4.0. Após 15 dias os calos foram peneirados e as suspensões de células foram mantidas por mais 15 dias, havendo troca de meio a cada sete dias. As suspensões celulares foram cultivadas no escuro em plataforma com agitação orbital de 100 rpm com temperatura de 26°C.

3.5.1.6.1. Parâmetros testados para transformação de suspensão celular

Vários parâmetros foram avaliados na busca de um sistema eficiente de transformação de células em suspensão.

Uso de calos para início da cultura com 25 a 40 dias em meio MSCLind; inoculação de calos friáveis e massa branca compacta separadamente em meio MSCLind líquido; uso de pH 5.8 ou pH 4.0 nos meios MSCLind e MSCLreg; células plaqueadas em meio de bombardeamento 24 ou 48 horas antes do bombardeamento; transferência para meio MSCLind líquido 24 ou 48 horas após o bombardeamento; bombardeamento de suspensão celular mais fina (isoladas) ou que já estavam aglomeradas; uso de meio DDI por seis dias antes da transferência para meio MSCLreg e seleção das células bombardeadas em concentrações iniciais de 5 ou 10 mg/L de higromicina.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização da expressão órgão-específica de seqüências de cDNA isoladas por DD-PCR de ovários de *B. brizantha*

4.1.1. Seleção de cDNA de expressão em ovário

4.1.1.1. *Northern* reverso em dot blot de DNA plasmidial

Foram testadas duas concentrações de DNA plasmidial, 100 e 250 ng, transferido para membrana HybondTM-N a vácuo, no *northern* reverso. Foi constatado que a hibridização com DNA plasmidial na concentração de 250 ng apresentou pontos mais fortes e evidentes no filme de raio X. Quando foi utilizado como sonda cDNA sintetizado a partir de RNA de antera, os clones 04, 09 e 21 apresentaram marcação fraca, e o clone 45 apresentou marcação forte. Já na membrana com a sonda sintetizada de RNA de folha, apenas o clone 45 mostrou marcação forte. Em membrana hibridizada com sonda preparada a partir de RNA de ovário, os clones 04, 09, 21 e 45 mostraram marcação forte (Figura 5).

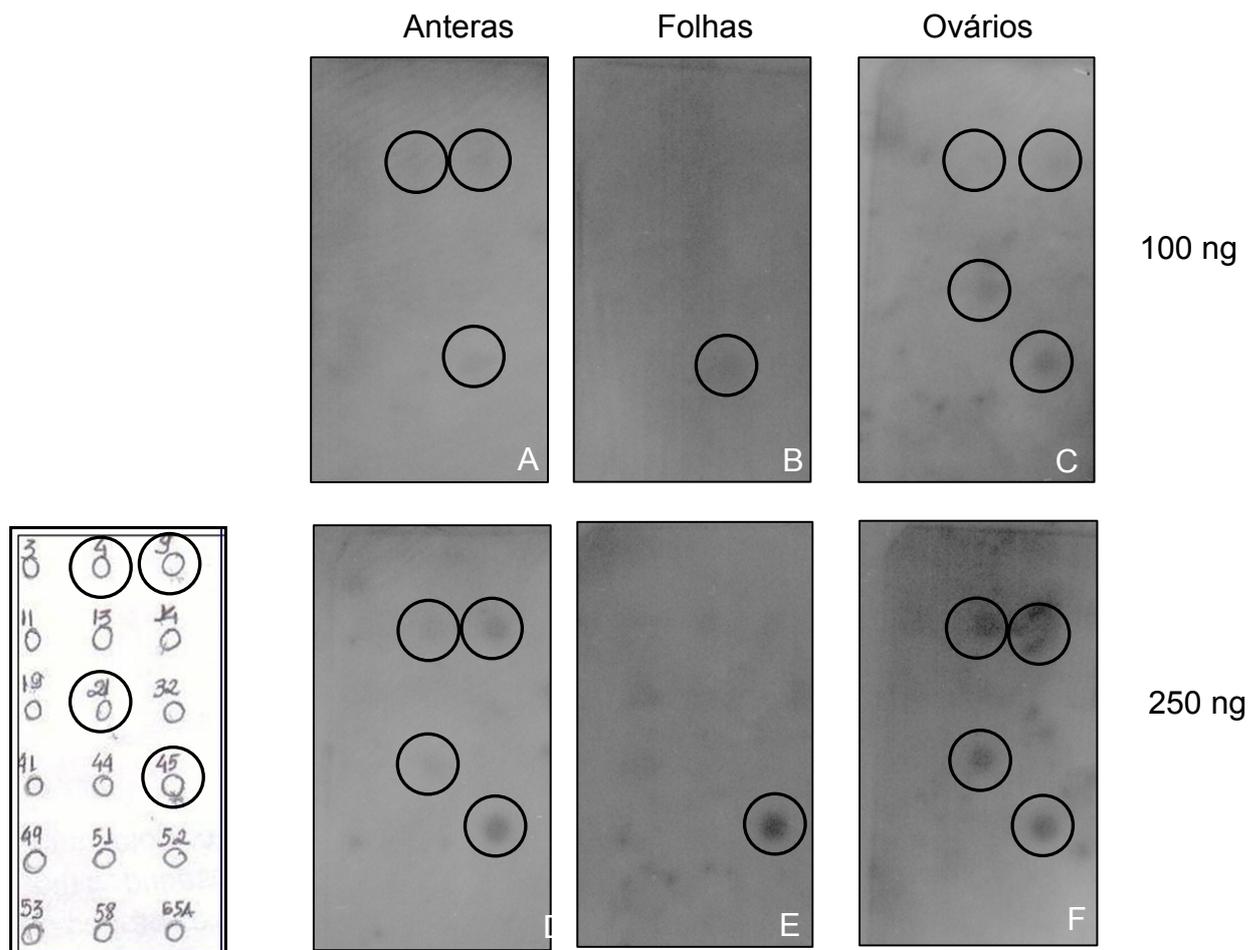


Figura 5 - Análise por *northern* reverso de seqüências de cDNA de expressão diferencial em ovários de plantas de *B.brizantha* apomíticas cv. Marandu e sexuais (BRA 002747) em técnica de dot-blot. O DNA plasmidial foi aplicado na membrana em réplica em duas concentrações (**A, B e C** :100ng de DNA e **D, E e F**: 250ng de DNA) e hibridizado contra cDNA de anteras (**A e D**), folhas (**B e E**) e ovários (**C e F**), marcado radioativamente. Em detalhe, mapa da membranas indicando a posição dos clones 04, 09, 21 e 45.

4.1.1.2. *Northern* reverso em produto de amplificação por PCR

cDNA de seis clones (clones 09, 19, 21, 41A, 44 e 58) foram amplificados por PCR utilizando os iniciadores T7 e SP6 e as bandas amplificadas foram transferidas para membrana por capilaridade (Figura 6). Os clones 09 e 21 apresentaram marcação com as sondas preparadas com cDNA sintetizado a partir de RNA de antera e de ovário, não apresentando marcação com a sonda

preparada com RNA de folha (Figura 6). Assim os clones 09 e 21 foram escolhidos para as caracterizações de seqüência.

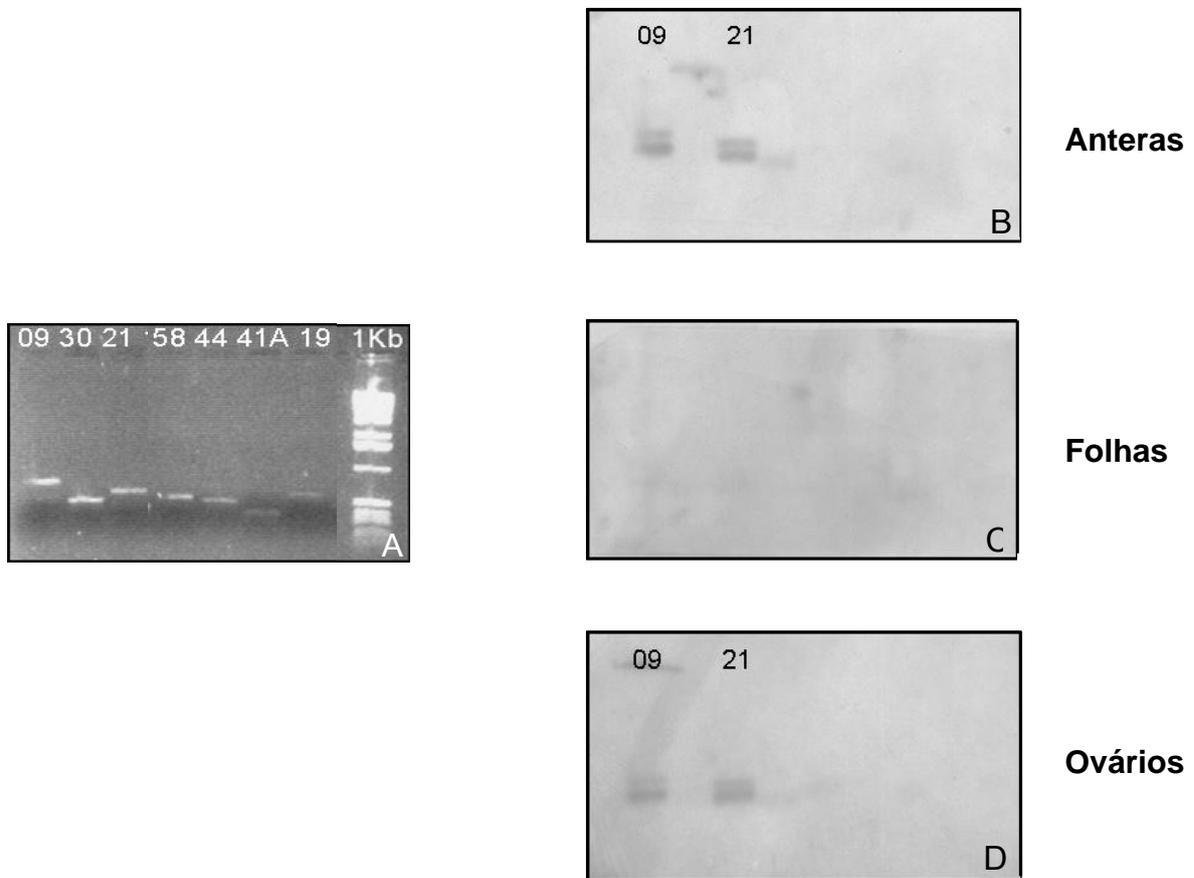


Figura 6 - Análise por *northern* reverso de seqüências de cDNA de expressão diferencial em ovários de plantas de *B.brizantha* apomíticas cv. Marandu e sexuais (BRA 002747) amplificadas por PCR. **A** - Eletroforese em gel de agarose 1% da amplificação por PCR das seqüências dos clones isolados de DD-PCR de *B. brizantha* apomíticas cv. Marandu (clone 30) e clones não diferenciais (clones 09, 19, 21, 41A, 44 e 58). Como marcador de massa molecular foi usado 1Kb *DNA ladder*. O DNA resultante de ampliações por PCR das seqüências diferenciais foi aplicado em réplicas nos géis, transferido para membranas e hibridizado contra cDNA de anteras (**B**), folhas (**C**) e ovários (**D**) marcados radioativamente.

4.2. Caracterização dos clones 09 e 21

4.2.1. Análise das seqüências dos clones 09 e 21

As seqüências dos clones 09 e 21 que hibridizaram com sondas de cDNA de antera e ovários foram comparadas em banco de dados. Análises em Blastn mostraram similaridade das seqüências do clone 09 e 21 com seqüências depositadas de bibliotecas de cDNA e genômicas. Os maiores índices de similaridade encontrados foram com seqüências de *Oryza sativa* e *Zea mays*.

A seqüência do clone 09 mostrou similaridade com seqüências de proteína ribossomal S8 de *Zea mays* e *Oryza sativa* (88% e 86%, respectivamente). A seqüência do clone 21 mostrou similaridade com proteína ribossomal L41 de *Hordeum vulgare* e *Nicotiana tabacum* (92% e 93%, respectivamente) (Tabela 2).

Quando as seqüências dos clones 09 e 21 foram comparadas com seqüências das bibliotecas de cDNA de *B. brizantha* apomítica (B30) e sexual (B105), o clone 09 mostrou similaridade com o *contig* 39 (500 nucleotídeos) composto por hits das bibliotecas de B30 estágio I e II e B105 estágio IV. Análises por Blast mostraram que esse *contig* possui similaridade com a proteína ribossomal S8 de milho (e-value $5e-28$), arroz (e-value $9e-28$) e de *A. thaliana* ($2e-25$). Já o clone 21 mostra similaridade com os *contigs* 34 (328 nucleotídeos) e 67 (277 nucleotídeos), ambos vindos de biblioteca de B30 I e II, esses *contigs* em análise de Blast não mostram similaridade com nenhuma seqüência do banco de dados do BLAST.

Tabela 2: Análise das seqüências dos clone 09 e 21 utilizando o programa BLASTN contra o banco nr (não redundante) de nucleotídeos do NCBI (www.ncbi.nlm.gov/ BLAST) (Altschul et al., 1997).

<i>Clone</i>	<i>Seqüência</i>	<i>e-value</i>	<i>Similaridade</i>	<i>Referência</i>
09	DQ244259.1 <i>Zea mays</i>	3e-61	87%	(Jia et al., 2006)
	U64436.1 <i>Zea mays</i> - proteína ribossomal S8	1e-60	88%	Betawar e Baysdorfer (NP)
	D38010.1 <i>Oryza sativa</i> -proteína ribossomal S8	9e-46	86%	(Nakamura et al., 1995)
	DQ428095.1 <i>Sorghum bicolor</i> seqüência genômica	3e-27	92%	(Hamblin et al, 2006)
	AY086963.1 <i>A. thaliana</i> clone 29997 mRNA	4e-20	88%	(Haas et al., 2002)
21	AK105083.1 <i>Oryza sativa</i> - cDNA clone	2e-34	98%	(Kikuchi et al., 2003)
	AY109380.1 <i>Zea mays</i> CL2281_1 mRNA sequence	9e-30	96%	(Gardiner et al., 2004)
	AP008214.1 <i>Oryza sativa</i>) - cromossomo 8	1e-25	98%	International Rice Genome Sequencing project, 2005
	AJ001160.1 <i>H. vulgare</i> L41 ribosomal protein	1e-19	92%	Rasmussen, S.K.(NP)
	U26255.1 <i>Nicotiana tabacum</i> ribosomal protein L41	5e-22	93%	Zhou, X.-R (NP)

NP: não publicado

4.2.2. Amplificação do cDNA do clone 21 por 5'RACE (*Rapid Amplification of cDNA ends*)

4.2.2.1. Verificação da qualidade do RNA e cDNA

A qualidade do RNA extraído de ovários de *B. brizantha* e o cDNA sintetizado foram verificados por eletroforese em gel de agarose 1,2% (Figura 7A e B).

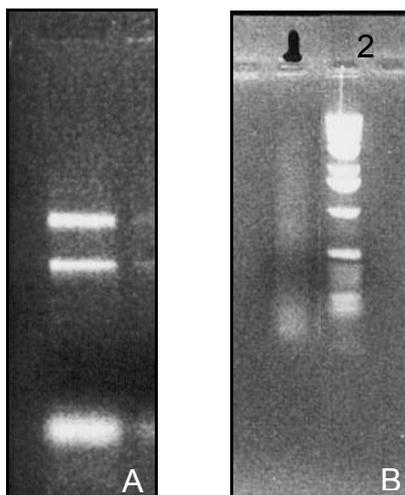


Figura 7 - Análise de RNA total, cDNA de ovários de *B.brizantha* cv. Marandu e amplificação por 5' RACE do clone 21. **A** - Visualização de RNA total de ovário estágio IV; **B** - coluna 1: Visualização de 2 μ L de cDNA sintetizado a partir de RNA poli-A⁺, coluna 2: marcador de massa molecular 1Kb *DNA ladder* (Invitrogen). Eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio 0,5 μ g/mL em tampão TBE.

4.2.2.2. Amplificação por 5' RACE do clone 21 e análise das seqüências obtidas

Reação de 5' RACE feita com o iniciador CL21 114 gerou um *smir* quando analisado por eletroforese em gel de agarose. A região do gel compreendida entre 500 pb e 1000 pb foi cortada e eluída (Figura 8A). Quando o produto eluído foi reamplificado por PCR com temperatura de anelamento em 55°C com o iniciador mais interno, CL21 56, obteve-se uma banda de 750 pb e outra de 400 pb (Figura 8B). Novas PCRs foram feitas com temperaturas de anelamento de 60° e 64°C confirmando e intensificando as duas bandas visualizadas anteriormente, mas

apresentando uma nova banda intermediária de 550 pb, mas sem sucesso na clonagem.

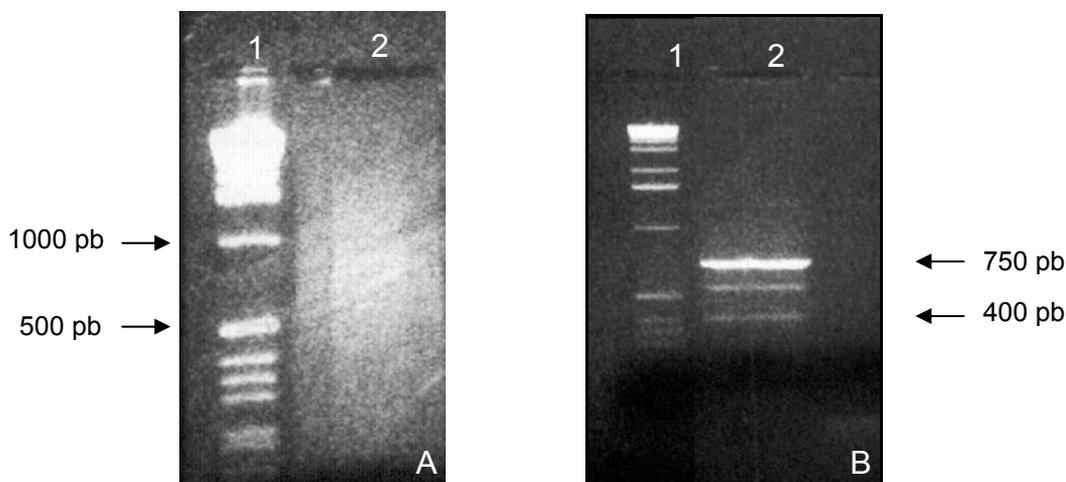


Figura 8 - Amplificação do clone 21 por 5' RACE. **A** - coluna 1: marcador de massa molecular 1Kb *DNA ladder* (Invitrogen), coluna 2: *Smir* resultante da reação de 5'RACE com o iniciador CL21 (114); **B** – coluna 1: marcador de massa molecular 1Kb *DNA ladder* (Invitrogen), 2- Bandas obtidas na amplificação por 5' RACE do clone 21 com o iniciador CL21 (56). Eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL em tampão TBE.

Após sequenciamento do DNA das amostras de 400 pb e 750 pb verificou-se que a banda de 400 pb e de 750 pb correspondem a uma mesma seqüência. A seqüência referente à banda de 400 pb estando compreendida na de 750 pb. Por análise das seqüências foi encontrado o iniciador do adaptador do Kit de 5'RACE, no entanto, a seqüência do iniciador específico do clone 21 não foi localizada.

4.3. Introdução, manutenção e micropropagação in vitro

Inicialmente os segmentos nodais das plantas vindas do campo eram desinfestados e inoculados diretamente em meio LS, mas a contaminação por fungos e bactérias atingiu 100% dos explantes. A utilização do fungicida Benlate no meio de cultura diminuiu a contaminação por fungos, mas a contaminação por bactérias foi acentuada. Retirando-se parte do tecido vascular dos segmentos nodais, deixando apenas a região que continha as gemas, a contaminação por

fungos diminuiu, não sendo mais necessária a utilização do fungicida. Quando se testou o isolamento e desinfestação das gemas, essas não resistiram à desinfestação e não se desenvolveram. A desinfestação com hipoclorito de sódio 5% por 20 minutos, após retirada do tecido vascular do segmento nodal, propiciou a introdução in vitro dos explantes.

Para induzir a micropropagação o melhor resultado foi inocular a região contendo as gemas em meio LS suplementado com 6 mg/L de cinetina (Figura 9A) em relação ao meio com 3 mg/L de cinetina. Deste modo observou-se que após duas semanas de cultivo, já havia a formação de múltiplos brotos a partir de uma gema (Figura 9B). Após sucessivos subcultivos em meio B, sem reguladores de crescimento, as plantas foram ficando amareladas e não formavam raízes (Figura 9D) . Com o uso do meio MMP, na presença de ANA 0,2 mg/L, cinetina 0,5 mg/L e GA₃ 0,2 mg/L as plantas se mantiveram vigorosas por mais tempo (Figura 9C) e foi observada maior formação de raízes, indicando que esse meio foi mais adequado para a manutenção das plantas in vitro a longo prazo se comparado com o meio B.

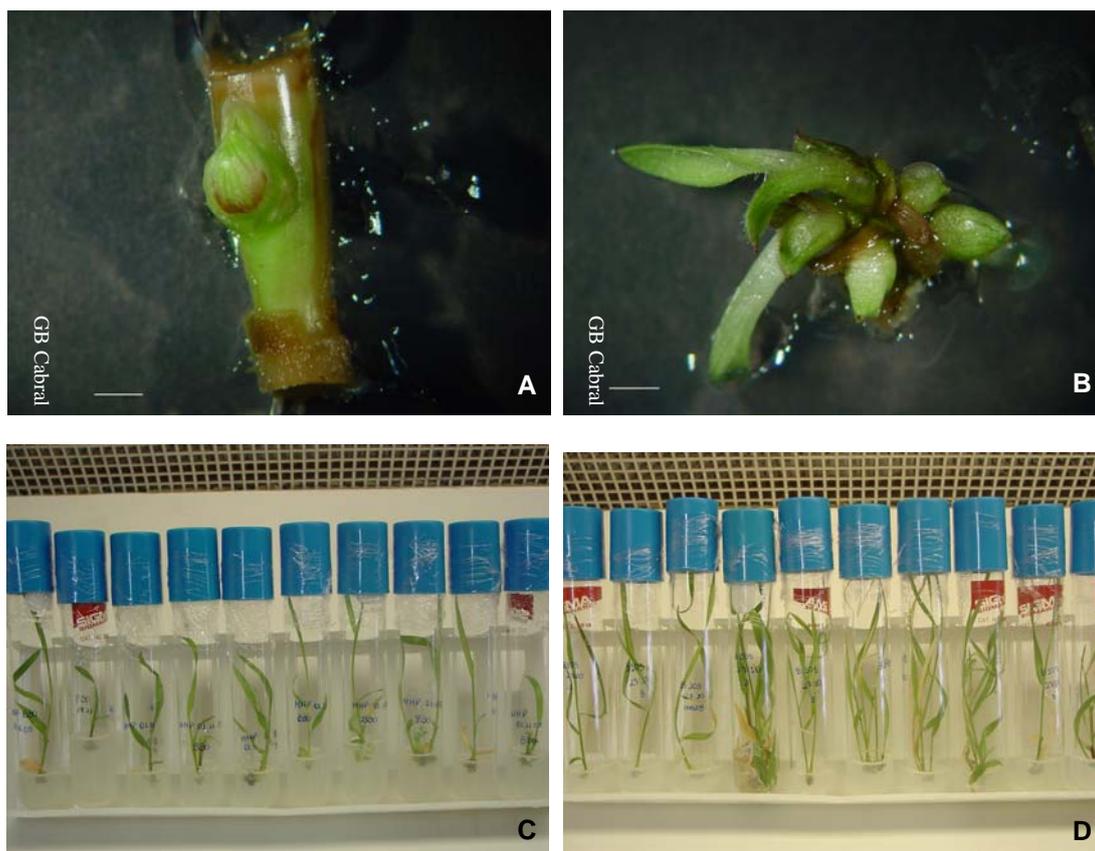


Figura 9 - A – Segmento nodal isolado de planta de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu cultivada no campo, evidenciando a exposição de gema axilar. barra \simeq 0,2 cm. **B** - Multibrotação originada de gema axilar em meio de micropropagação LS modificado. barra \simeq 0,3 cm. **C** - Plantas de *B. brizantha* cv. Marandu em meio de cultura de manutenção de plantas (MMP). **D** - Plantas de *B. brizantha* sexual BRA 002747 em meio de cultura sem reguladores de crescimento (meio B modificado).

4.4. Análise do potencial de diferentes explantes de *B. brizantha* para transformação genética

4.4.1. Estrutura dos segmentos basais de plantas cultivadas in vitro

Em secções dos cortes apicais dos segmentos basais das plantas in vitro analisadas em microscópio Zeiss – Axiophot, foi observada apenas a estrutura do colmo com predominância de feixes vasculares, mais externamente xilema e floema e internamente células do parênquima (Figura 10). Como apresentado na tabela 3, não foi observada a presença de gema ou primórdio no dia zero ou com 14 dias em meio de micropropagação nos cortes apicais. Os cortes basais e medianos antes da cultura (dia zero) apresentaram gema e primórdio, indicando a

existência de meristemas adventícios pré-formados (Figura 11A e B). Nos cortes basais e medianos em citocininas por sete e 14 dias foram observadas mais gemas do que primórdios, indicando a quebra da dominância apical resultando no crescimento de gemas adventícias (Tabela 3, Figura 11C e D). Em microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura foi visualizado que os meristemas da base estolonífera das plantas cultivadas in vitro não são expostos, sendo bastante protegidos por folhas (Figuras 11 e 12).

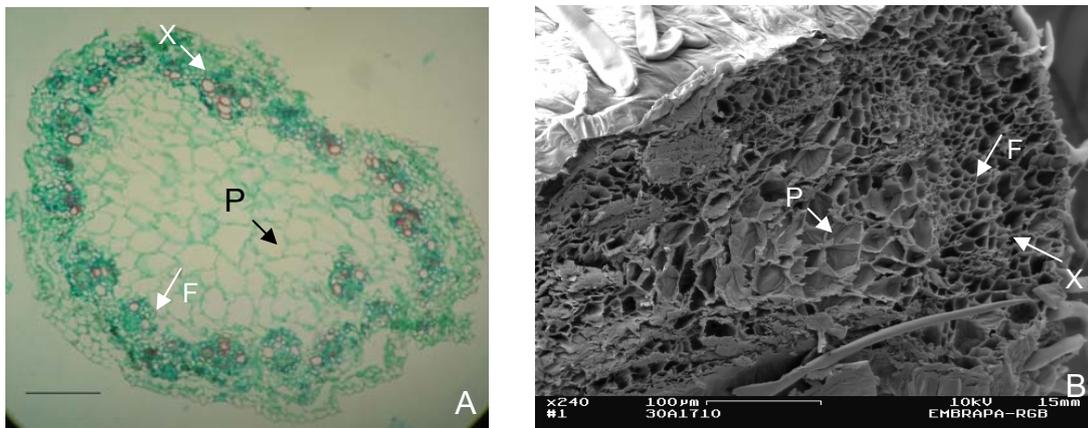


Figura 10 - Corte apical dos segmentos basais de *B. brizantha* cv. Marandu (B 30) e sexual (BRA 002747 – B 105) de plantas cultivadas in vitro e inoculados em meio de micropropagação. **A** - Secção transversal do corte apical de B 105 após 14 dias de cultura. barra \approx 300 μ m. **B** – Micrografia eletrônica de varredura de corte apical de B 30 com vista transversal após 11 dias de cultura. Barra = 100 μ m. F: floema, P: parênquima, X: xilema.

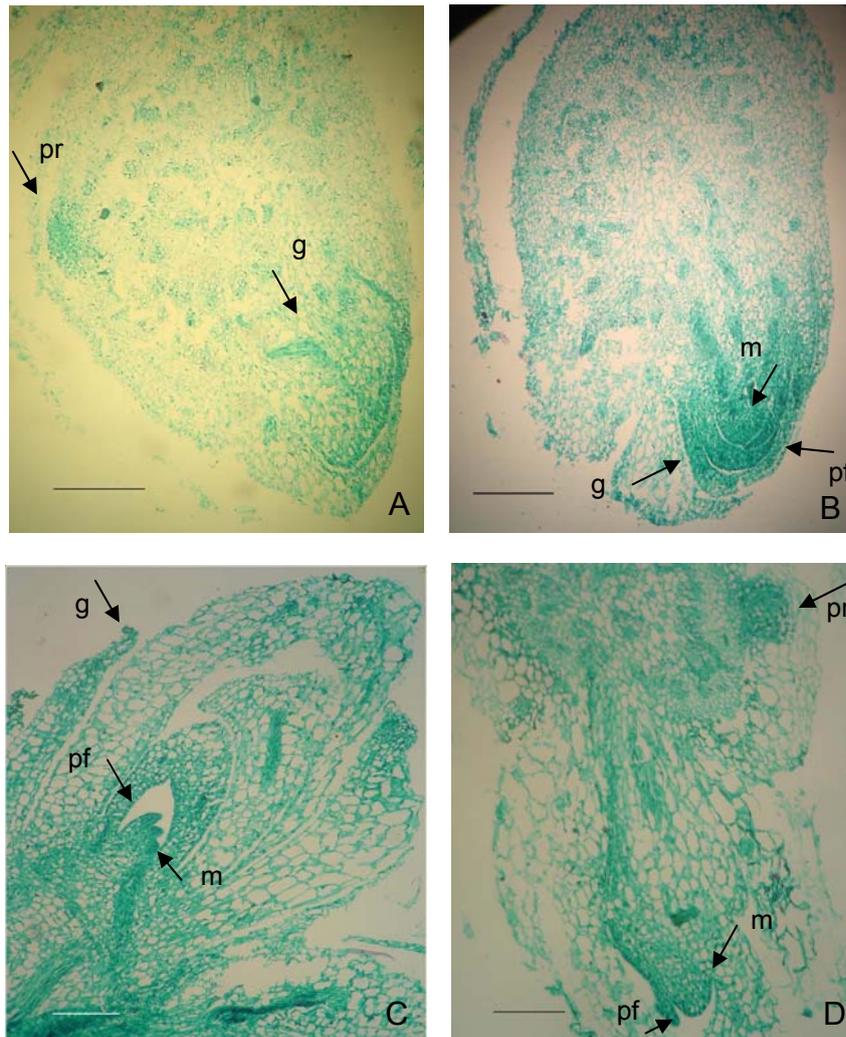


Figura 11 - Corte basal dos segmentos basais de *B. brizantha* cv. Marandu (B 30) de plantas cultivadas in vitro e inoculados em meio de micropropagação. Visualização em microscopia de luz. **A** - Secção transversal mais interna do corte basal de B 30 no dia zero de cultura evidenciando a presença de primórdio e gema. barra $\simeq 600 \mu\text{m}$. **B** - Secção transversal mais externa do corte basal de B 30, mostrado na figura A, no dia zero de cultura evidenciando a presença de gema adventícia pré-formada, com vários primórdios foliares protegendo o meristema. barra $\simeq 600 \mu\text{m}$. **C** - Secção longitudinal do corte basal de B 30 com sete dias de cultura mostrando o crescimento de gema adventícia. barra $\simeq 520 \mu\text{m}$. **D** - Secção longitudinal do corte basal de B 30 após 14 dias de cultura mostrando um primórdio de gema e uma gema em brotação com meristema bem evidente. barra $\simeq 520 \mu\text{m}$. pr: primórdio de gema, g: gema, m: meristema, pf: primórdio foliar.

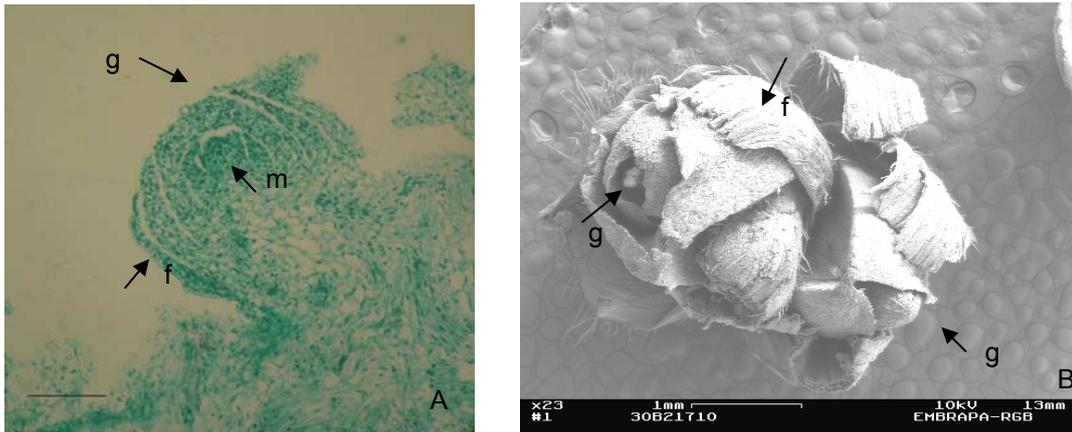


Figura 12 – Corte basal dos segmentos basais de plantas cultivadas in vitro de *B. brizantha* cv. Marandu inoculados em meio de micropropagação mostrando gemas protegidas por folhas. **A** - Secção longitudinal do corte basal de B 30 com um dia de cultura, mostrando a presença de gemas por microscopia de luz. barra \simeq 260 μ m. **B** - micrografia eletrônica de varredura de corte basal de B 30 com dez dias de cultura, mostrando duas gemas em brotação. barra = 1 mm. g: gema, f: folhas, m: meristema.

Pode-se observar na tabela 3 que a planta apomítica responde mais rapidamente à citocinina do que a planta sexual, pois em sete dias de cultivo ocorreu maior número de gemas e primórdios enquanto na planta sexual apenas com 14 dias foi observado o maior número de gemas e primórdios.

Tabela 3: Descrição das secções dos cortes apical, mediano e basal de segmentos basais de plantas cultivadas in vitro de *B. brizantha* mostrando o número de primórdios de gemas e gemas encontrados. A visualização dos cortes foi feita em microscópio Zeiss – Axiophot. APO: plantas apomíticas, SEX: acesso sexual

EXPLANTES	PRIMÓRDIO	GEMA
APO 1dia basal 1 transversal	1	1
APO 1dia basal 2 longitudinal	----	1
APO 1dia mediano1 transversal	1	----
APO 1dia mediano 2 longitudinal	----	----
APO 1dia apical 2 transversal	Presença de feixes vasculares, sem primórdios ou gemas	
Total	2	2
APO 7dias basais 1 longitudinal	1	4
APO 7dias basais 2 transversal	----	3
APO 7dias mediano 1 longitudinal	----	3
APO 7dias mediano 2 transversal	----	----
APO 7dias apical 1 transversal	----	----
APO 7dias apical 2 longitudinal	----	----
Total	1	10
APO 14dias basal 1 longitudinal	1	1
APO 14dias mediano 1 transversal	----	1
APO 14dias mediano 2 transversal	1	1
APO 14dias apical 1 longitudinal	----	----
Total	2	3
SEX 1dia basal 1 transversal	----	1
SEX 1dia basal 2 transversal	1	----
SEX 1dia mediano 2 transversal	Presença de folhas, sem primórdios ou gemas	
SEX 1dia apical 1 transversal	Presença de folhas, sem primórdios ou gemas	
SEX 1dia apical 2 longitudinal	----	----
Total	1	1
SEX 7dias basais 1 transversal	1	2
SEX 7dias basal 2 longitudinal	1	1
SEX 7dias mediano 1 transversal	1	1
SEX 7dias mediano1 transversal	----	----
SEX 7dias apical 1 transversal	----	----
SEX 7dias apical 2 longitudinal	----	----
Total	3	4
SEX 14dias basal 1 transversal	----	2
SEX 14dias basal 2 longitudinal	----	3
SEX 14dias mediano1 longitudinal	1	2
SEX 14dias apical 1 transversal	Presença de feixes vasculares, sem primórdios ou gemas	
Total	1	7

4.4.2. Embriões isolados de sementes maduras

4.4.2.1. Efeito do período de indução de embriogênese somática anterior ao bombardeamento

Entre o terceiro e o quinto dia de cultura dos embriões em meio de indução M1.2 foi constatada a presença de áreas com intensa proliferação celular no escutelo, resultando na formação de calos friáveis e intumescimento do embrião devido ao

efeito da auxina 2,4D no meio (Figura 13). Em alguns embriões foi observado o crescimento do coleóptilo. A partir do quinto dia em cultura, a manipulação dos embriões ficou mais difícil devido à expansão e aumento da fragilidade dos explantes, principalmente nos embriões com sete dias, onde o coleóptilo já estava bem intumescido e se soltando com muita facilidade do explante original, podendo haver perda de material.

Nos embriões bombardeados após um, três, cinco ou sete dias de cultura foi observado que a expressão do gene *gus* foi aumentando naqueles cultivados até cinco dias (Figura 13), decaindo em embriões bombardeados após sete dias em cultura (Tabela 4). Quanto ao padrão de expressão do gene *gus* observou-se que as células do coleóptilo, ou os tecidos mais estruturados frequentemente eram os que apresentavam expressão, sendo rara a observação de células GUS positivas em calos friáveis (Figura 13).

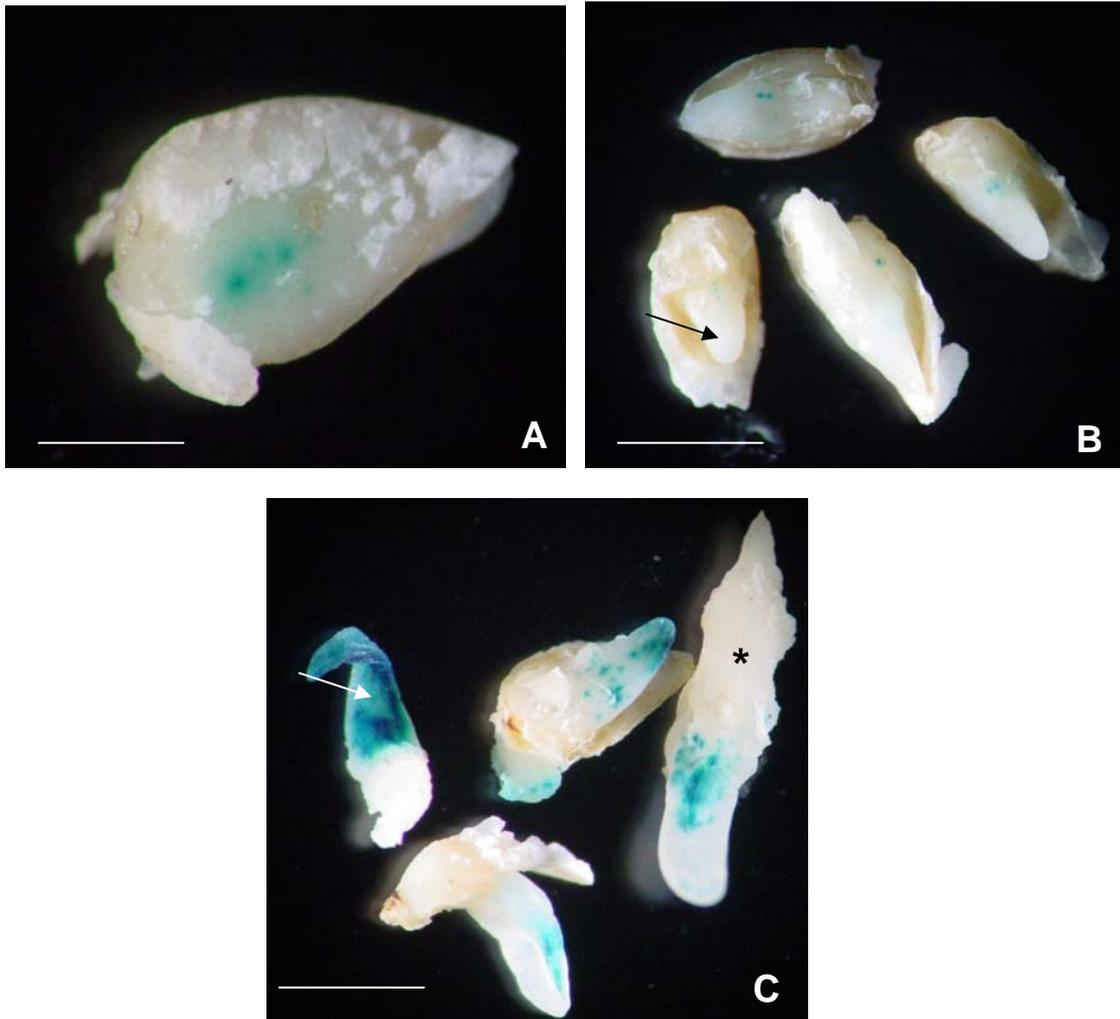


Figura 13 - Expressão do gene *gus* em embriões isolados de sementes maduras de *B. brizantha* cv. Marandu, inoculados em meio M1.2, 24 horas após a transformação por biobalística, utilizando o vetor pAct1-D. **A** – embrião após um dia de cultura. barra \simeq 470 μ m. **B** - embriões após três dias mostrando intumescimento do coleóptilo (seta). barra \simeq 1,8 mm. **C** - embriões após cinco dias de cultura, mostrando coleóptilo em crescimento (seta) e calos em desenvolvimento (*) barra \simeq 1,5 mm. Região azul evidencia a expressão do gene *gus*.

Os resultados da tabela 4 indicam que cinco dias de cultivo de embriões isolados, anterior ao bombardeamento com o gene repórter *gus*, foi mais favorável para transformação, uma vez que 39% dos embriões eram GUS positivo.

Tabela 4: Expressão do gene *gus* em embriões isolados de semente madura de *B.brizantha* cv. Marandu, cultivados em diferentes períodos em meio de indução M1.2, 24 horas após serem bombardeados com o plasmídeo pAct1-D. Foram analisados, por teste histoquímico, 75 embriões por tratamento.

Período de cultivo anterior ao bombardeamento	Nº de embriões GUS positivo
1 dia	9 (12%)
3 dias	13 (17%)
5 dias	29 (39%)
7 dias	20 (27%)

4.4.2.2. Estabilidade do gene *gus* em embriões bombardeados

De acordo com a tabela 5 pode-se observar que os embriões bombardeados após três dias de cultivo apresentaram maior número e área de expressão do gene *gus*, independentemente do meio de indução usado (M1 ou M1.2), quando comparado com os embriões cultivados por um dia antes do bombardeamento.

A figura 14 apresenta sinais de diminuição da expressão de *gus* após 20 dias em embriões bombardeados após três dias de indução.

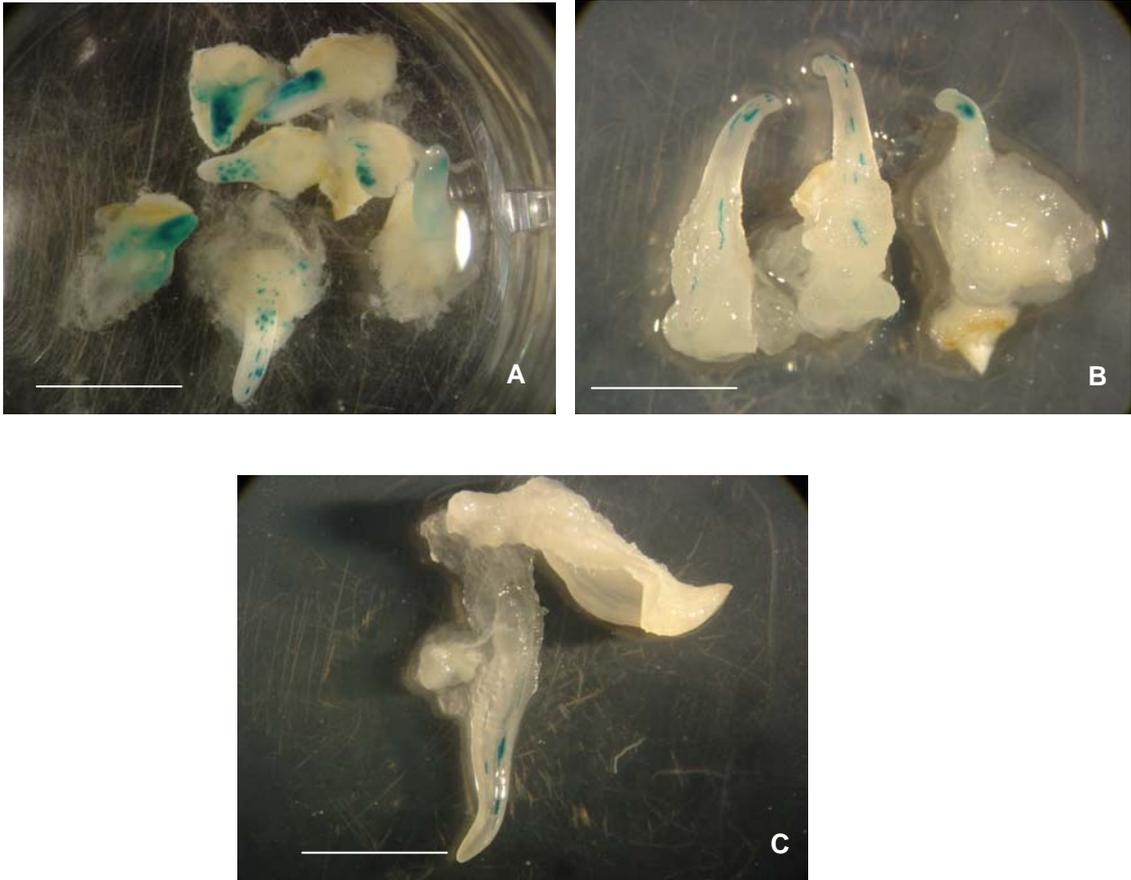


Figura 14 – Embriões isolados de sementes maduras de *B. brizantha* cv. Marandu, em diferentes meios de cultura de indução de embriogênese, após bombardeamento com o vetor pAct1-D. **A** - Embriões com três dias de cultura em meio M1 anterior ao bombardeamento e análise da expressão do gene *gus* com um dia após bombardeamento. barra \simeq 2,4 mm. **B** - Análise da expressão do gene *gus* em embriões com três dias de cultura em meio M1.2, dez dias após bombardeamento. barra \simeq 2,4 mm. **C** - Embrião com três dias de cultura em meio M1.2 anterior ao bombardeamento e com análise da expressão do gene *gus* 20 dias após o bombardeamento. barra \simeq 2,4 mm.

Tabela 5: Expressão do gene *gus* em embriões isolados de semente madura de *B.brizantha* cv. Marandu em diferentes dias (1, 10 e 20 dias) após o bombardeamento e indução em diferentes meios de cultura (M1 e M1.2).

Tempo em meio indução	Meios de Cultura	Nº de explantes com pontos azuis após o bombardeamento								
		1 dia (40 embriões)			10 dias (20 embriões)			20 dias (20 embriões)		
		total	%	intensid	total	%	intensid	total	%	intensid
1 dia	M1	27	67	25 +	4	20	3 +	2	10	2 +
				13 ++						2++
				3 +++						
	M1.2	23	57	18 +	4	20	3+	2	10	2 +
				8 ++			1++			1++
3 dias	M1	35	87	28 +	17	85	12+	10	50	6+
				19 ++						10++
				5 +++						
	M1.2	36	90	26 +	16	80	13 +	6	30	2 +
				13 ++			11 ++			4 ++
				5+++			2 +++			

+ pontos pequenos, ++ pontos fortes, +++ pontos muito fortes (áreas)

Nos embriões cultivados por um dia antes do bombardeamento, foi observada maior redução da expressão do gene *gus*, de 67% para 20%, no intervalo de um a dez dias de cultivo após o bombardeamento; enquanto nos embriões bombardeados após três dias de cultivo a redução da expressão foi muito pequena, de 87% para 85%, no mesmo período. Nos dois tratamentos, um e três dias, a redução da expressão de *gus* foi de 85% e 43%, respectivamente, quando comparada à expressão de um e de 20 dias após o bombardeamento, quando observado o tratamento em meio M1.

Após 30 dias em meio de indução, os explantes foram transferidos para o meio de regeneração MS1 ou MS2, e após 30 dias nesse meio foi observada uma ampla diversidade de estruturas desenvolvidas, como calos friáveis, calos friáveis com brotos e raízes, massa branca compacta com a formação de brotos, raízes e

embriões. Os testes histoquímicos para expressão do gene *gus*, com as estruturas desenvolvidas, foram negativos.

4.4.3. Calos embriogênicos

Sementes maduras de plantas apomíticas (Figura 15A) foram inoculadas em meio MSCLind e após oito a dez dias no meio de indução foi observada a formação de calos friáveis no escutelo do embrião. Após uma semana era possível observar a formação de massa branca compacta, tecido organizado que é o escutelo do embrião somático em diferenciação, originado dos calos friáveis (Figura 15B). Após esse período ocorreu uma proliferação das células dos calos friáveis e massa branca e com 30 dias de cultura os calos já estavam bem desenvolvidos (Figura 15C).

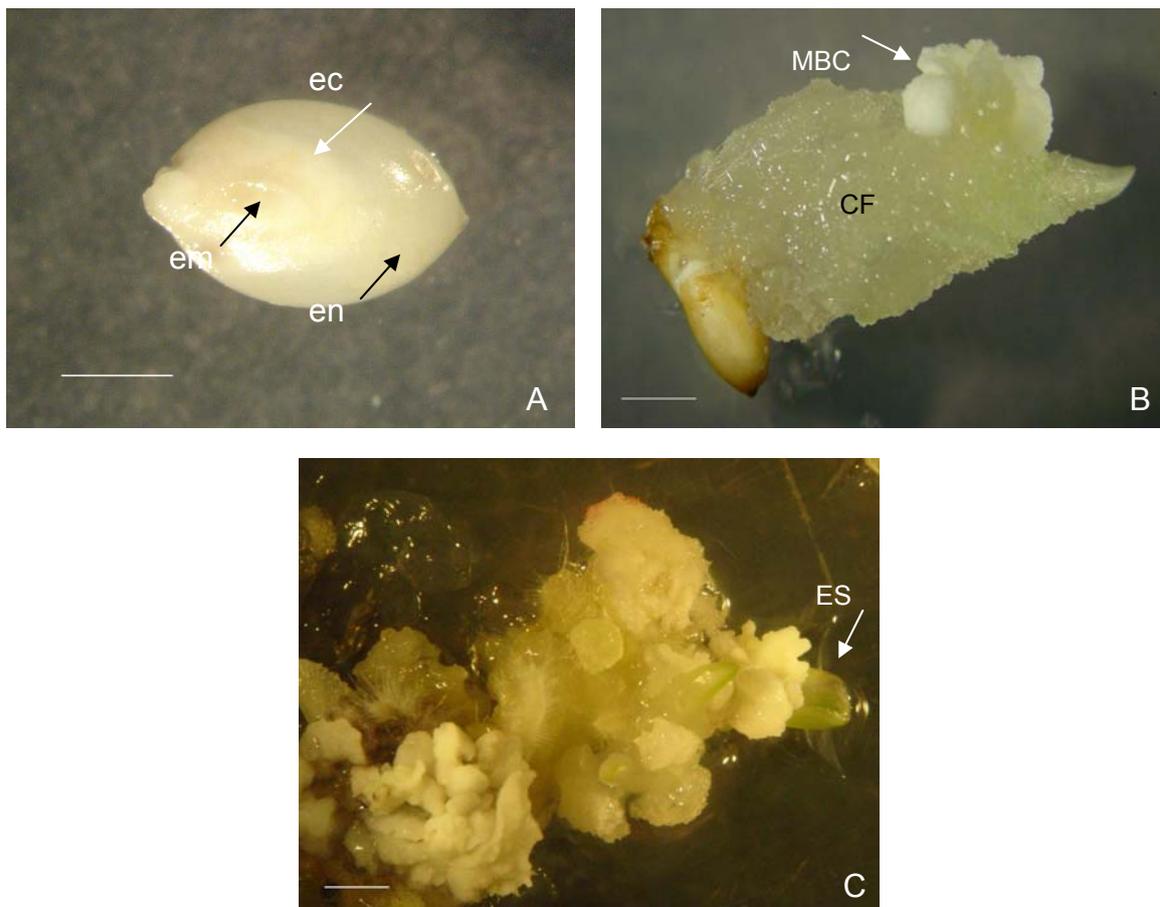


Figura 15 – Desenvolvimento de calos embriogênicos em *B. brizantha* cv Marandu, a partir de semente madura. **A** – Semente madura. barra \simeq 0,8 cm. **B** - Formação de calos friáveis no escutelo do embrião da semente madura e início da formação de massa branca compacta. barra \simeq 35 mm. **C** – Calo desenvolvido mostrando a heterogeneidade estrutural e a diversidade de estágios de diferenciação. barra \simeq 12 mm. CF: calo friável, ES: embrião somático, MBC: massa branca compacta, em: embrião da semente apomítica, ec: escutelo, en: endosperma.

4.4.3.1. Comparação do bombardeamento de embriões e calos embriogênicos

A análise histoquímica de embriões e calos embriogênicos dois dias após serem bombardeados demonstrou expressão em ambos os explantes quando usados os plasmídeos pAct1-D ou pAHC27, no entanto com o plasmídeo pAHUG não houve expressão de *gus* (Tabela 6).

Tabela 6: Expressão do gene *gus* (pontos azuis) em embriões isolados de semente madura de *B.brizantha* cv. Marandu e calos embriogênicos bombardeados com os plasmídeos pAct1-D e pAHC27.

Explante	Nº de explantes com pontos azuis após o bombardeamento					
	pAct1-D			pAHC27		
	total	Exp.	Intens	total	Exp	Intens
Embriões	22	10	9 +	18	5	1 +
			2 ++			3++
						1+++
Calos	14	7	7 +	12	6	5 +
			2 ++			2++

+ pontos pequenos, ++ pontos fortes, +++ pontos muito fortes (áreas)

- Bombardeamento com o plasmídeo pAct1-D e pAHC 27

Os embriões transferidos para meio MSCLind apresentaram contaminação por fungos ou bactérias endógenas.

A maioria dos calos transferidos para meio MSCLreg após o bombardeamento apresentou contaminação ou morreu. Alguns calos regeneraram brotos que foram transferidos para meio MMP e depois para meio B. Oito plantas oriundas do bombardeamento com pAct1-D, foram analisadas por PCR e a figura 16 mostra que todas as amostras foram negativas para a presença do gene *gus*.

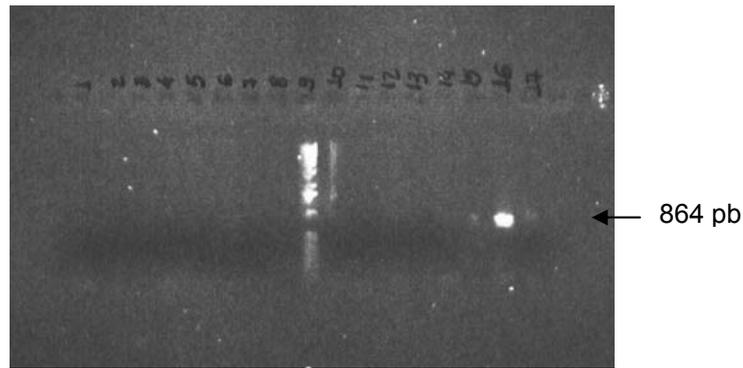


Figura 16 – Análise por eletroforese em gel de agarose 1% da PCR de plantas regeneradas de embriões de *B. brizantha* cv. Marandu bombardeados com o plasmídeo pAct1-D. Na coluna 9 o marcador de peso molecular 1Kb DNA *ladder* e na coluna 16 30ng do plasmídeo pAct1-D (controle positivo, fragmento de 864 pb relativo a amplificação do gene *gus*). Reações de PCR realizadas com os iniciadores para o gene *gus*.

- Bombardeamento com o plasmídeo pAHUG

Os embriões bombardeados que foram transferidos para meio MSCLind com 5 mg/L de higromicina não sobreviveram à seleção.

Dos 28 calos transferidos para meio MSCLreg com 5 mg/L de higromicina após dez dias de cultivo apenas três sobreviveram tendo sido transferidos para meio MSCLreg com 10 mg/L de higromicina. Após 20 dias foi observada uma multibrotação em um dos calos, da qual foram individualizados nove brotos que foram transferidos para meio MMP com 20 mg/L de higromicina. Após duas semanas sob essa pressão de seleção as plantas morreram.

4.4.3.2. Bombardeamento de calos embriogênicos

Apenas os calos com 25 dias em meio MSCLind bombardeados com pAHUG, foram transferidos para meio MSCLreg com 5 mg/L de higromicina dois dias após o bombardeamento. Após 15 dias o explante sobrevivente foi transferido para MSCLreg com 10 mg/L de higromicina e 20 dias depois, a multibrotação sobrevivente foi individualizada em três plântulas que foram transferidas para meio MMP com 20 mg/L de higromicina. As plantas não sobreviveram à dose de seleção.

Os calos embriogênicos mostraram heterogeneidade estrutural, tendo sido observados calos friáveis, massa branca compacta (escutelo), embriões e algumas vezes, raízes e primórdios foliares. A expressão do gene *gus* nos calos embriogênicos bombardeados foi mais observada em regiões mais diferenciadas, como por exemplo, em massa branca compacta (escutelo) (Figura 17). Secções de embriões somáticos regenerados a partir dos calos embriogênicos bombardeados mostraram a expressão do gene *gus* apenas no coleóptilo e primórdio foliar que envolvem o meristema apical do embrião, além da região logo abaixo do meristema apical, no eixo embrionário (Figura 18).

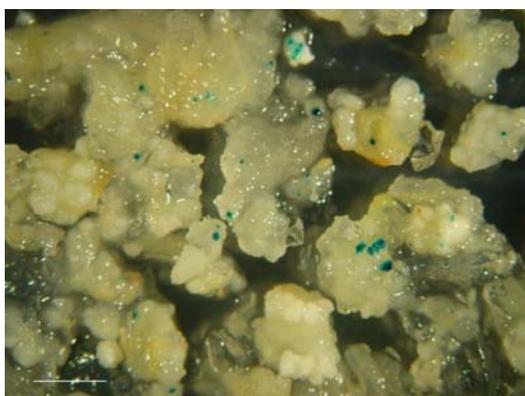


Figura 17 - Expressão do gene *gus* em calos embriogênicos de *B. brizantha* cv. Marandu, 48 horas após o bombardeamento de partículas, utilizando o vetor pAHUG. barra \simeq 24,4 mm.

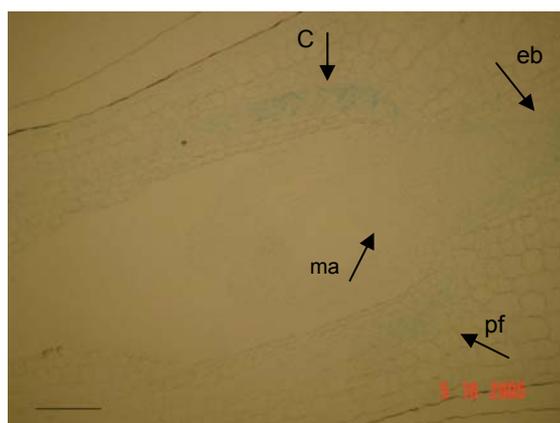


Figura 18 - Secção longitudinal de embrião somático de *B. brizantha* cv. Marandu expressando gene *gus* em microscopia de luz. barra \simeq 520 μ m. C: coleóptilo, eb: eixo embrionário, ma: meristema apical, pf: primórdio foliar.

4.4.3.3. Efeitos do tratamento osmótico no bombardeamento e na seleção dos transformantes em calos embriogênicos

O tratamento osmótico em sacarose 12% resultou numa grande plasmolização das células tendo os calos ficado com o volume bastante reduzido. Quando os calos foram transferidos para meio MSCLind 48 horas após o bombardeamento foi observada a re-hidratação dos mesmos.

Os calos submetidos ao teste histoquímico demonstraram que a expressão do gene *gus* ocorreu nas áreas mais diferenciadas dos calos, massa branca compacta que é o escutelo do embrião somático (Figura 19A), sendo coincidente com as regiões competentes para transformação genética e regeneração, no entanto, já encontram-se em estado de diferenciação avançado.

Em relação à seleção observou-se que higromicina 30mg/L é uma dosagem muito elevada, pois todos os explantes morreram em duas semanas (Figura 19B), e em 15mg/L de higromicina dois calos embriogênicos regeneraram multibrotações sobreviveram e foram separados originando nove brotos (Figura 19C e D) sendo transferidos para o meio MMP com 20mg/L de higromicina, não sobrevivendo após dez dias de tratamento (Figura 19E).

Para o controle de regeneração 14 calos foram introduzidos em meio, passando por todas as etapas dos calos bombardeados menos pelo bombardeamento. Quando em meio de regeneração 67 brotos regeneraram desses calos (Figura 19F).

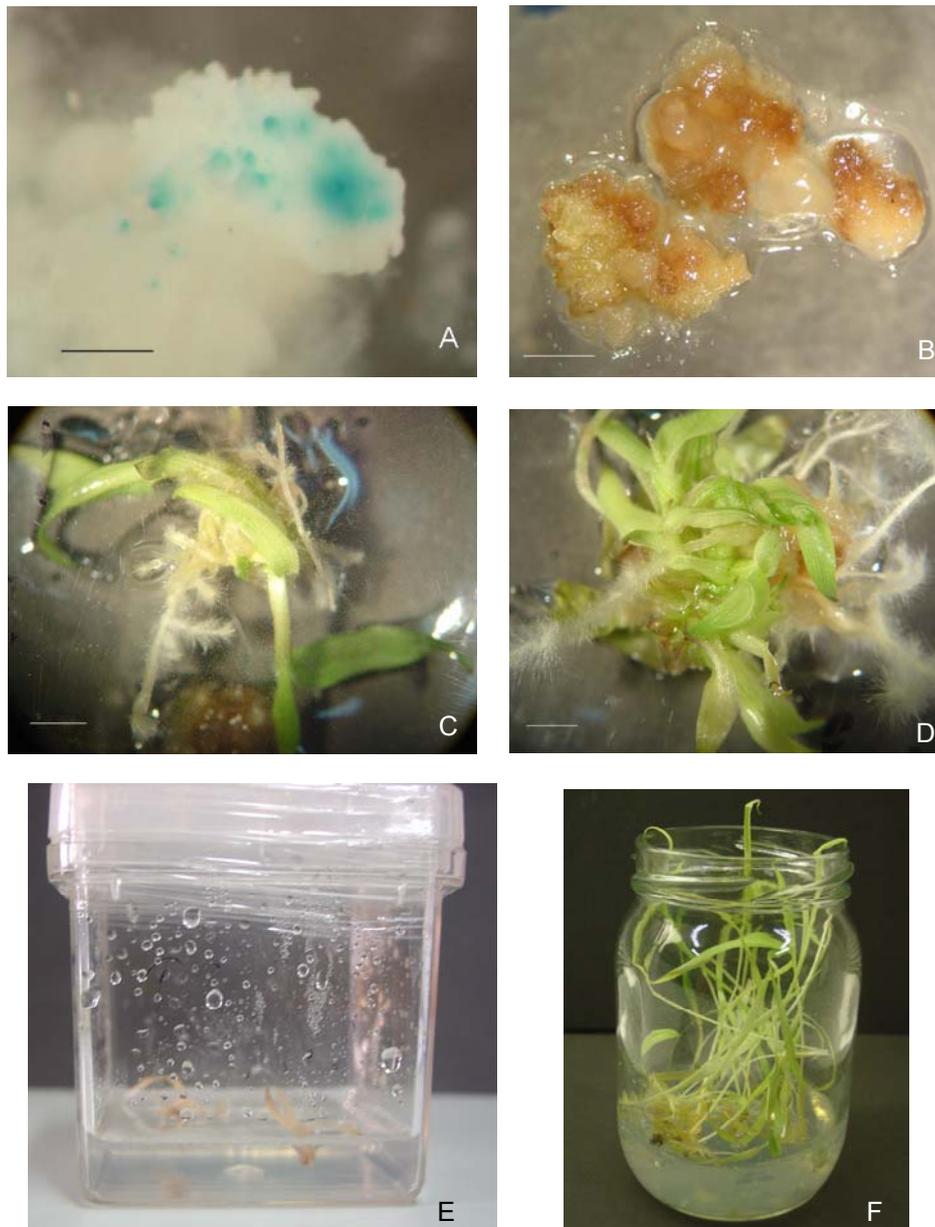


Figura 19 - Regeneração de calos embriogênicos de *B. brizantha* cv. Marandu submetidos à biobalística. **A** - Expressão do gene *gus* em calos embriogênicos, 24 horas após o bombardeamento de partículas, utilizando o vetor pAHUG. barra \simeq 5,2 mm. **B** - Calos que não sobreviveram à seleção em higromicina 30mg/L no meio MSCLind. barra \simeq 17,3 mm. **C** e **D** - Brotos alongando em higromicina 15mg/L no meio MSCLreg. barra \simeq 34,6 mm. **E** - Brotos mortos em higromicina 15mg/L no meio MMP. **F** - Controle de regeneração da transformação genética, plântulas em meio de manutenção de plantas - MMP.

4.4.4. Células em suspensão

Em experimentos em que os calos friáveis foram inoculados em meio líquido separadamente da massa branca compacta foi observado que células oriundas de calos friáveis mostraram menor oxidação do que as células oriundas de massa branca compacta, que apresentaram alta oxidação.

4.4.4.1. Efeito do pH na obtenção de suspensão celular

Células em suspensão obtidas de calos e cultivadas em meio de indução MSCLind com pH 4.0 apresentaram menor oxidação (Figura 20), maior regeneração de calos embriogênicos (Figura 21), quando comparadas com as obtidas em pH 5.8.

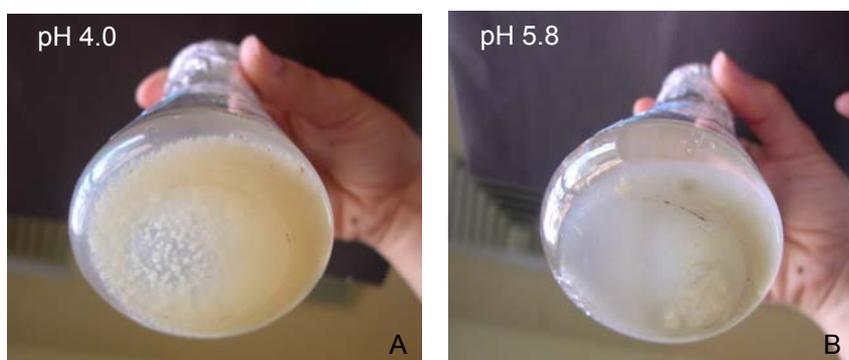


Figura 20 - Cultivo de suspensão celular de *B.brizantha* cv. Marandu em meio MSCLind. **A** - pH 4.0. **B** - pH 5.8.

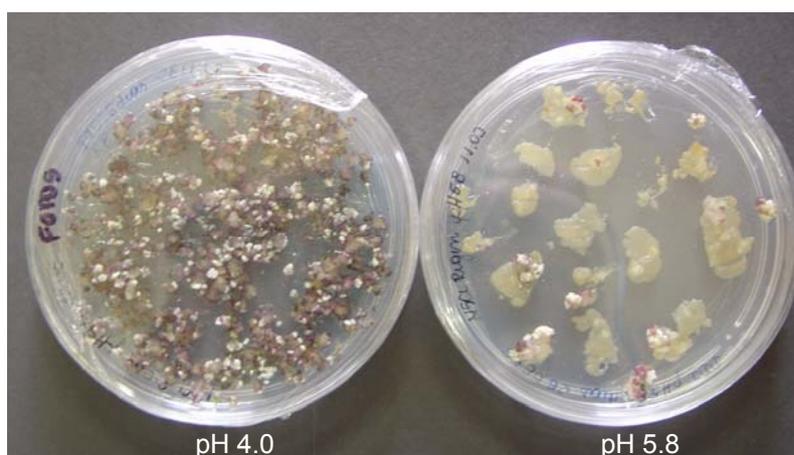


Figura 21 - Comparação da eficiência de regeneração de suspensão celular de *B. brizantha* cv. Marandu em meio MSCLreg com pH 4.0 e pH 5.8.

4.4.4.2. Efeito da redução da auxina 2,4D na regeneração da suspensão celular

Células em suspensão mantidas em meio de cultura MSCLind com 3 mg/L de 2,4D durante 30 dias foram transferidas para meio de regeneração, tendo ocorrido a proliferação de raízes (Figura 22A). Para favorecer a regeneração de brotos, as suspensões celulares foram transferidas para meio DD1 com menor concentração de 2,4D antes da transferência para o meio MSCLreg. Foi observado que a redução da concentração de 2,4D foi determinante para que a proliferação de raízes fosse reduzida e a resposta à formação de embriões e brotos aumentada quando em meio de regeneração (Figura 22B).

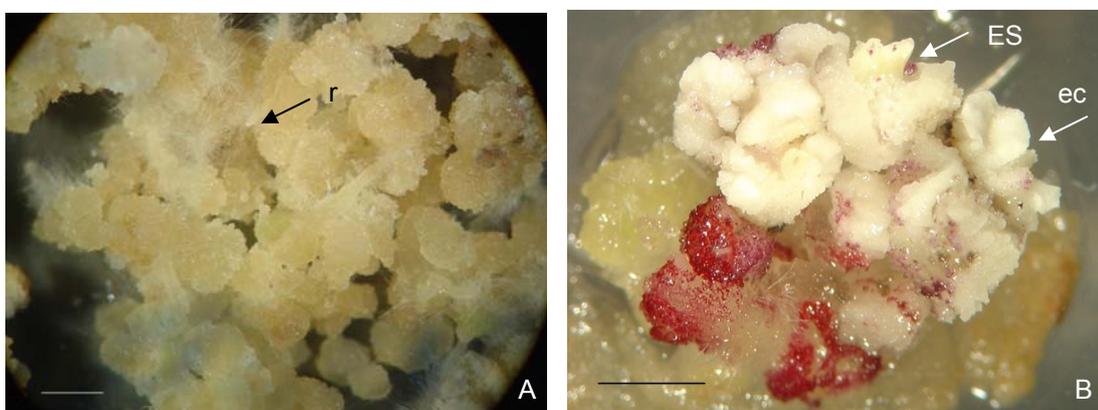


Figura 22 - Calos de *B. brizantha* cv. Marandu em regeneração. **A** - Calos em meio MSCLreg pH 5.8 sem passagem pelo meio DD1 mostrando a proliferação de raízes. barra \simeq 28,8 mm. **B** - Calos em meio MSCLreg pH 5.8 após seis dias em meio DD1 evidenciando a formação de embrião somático. barra \simeq 28,8 mm. ES: embrião somático, r: raízes, ec: escutelo.

4.4.4.3. Parâmetros usados para transformação genética de suspensão celular

Na figura 23A pode ser observado por coloração com carmim acético e na figura 23B em MEV o formato e a estrutura das células vindas de suspensão celular. Essas células fortemente coradas são pequenas, arredondadas e densas, e apresentam potencial embriogênico, sendo viáveis para regeneração e transformação. Outras células altamente vacuolizadas, em forma de bastão são inviáveis e não são coradas com carmim acético. Na figura 23C observa-se um

embrião somático corado com carmim acético e várias células vacuolizadas não coradas em cultura líquida.

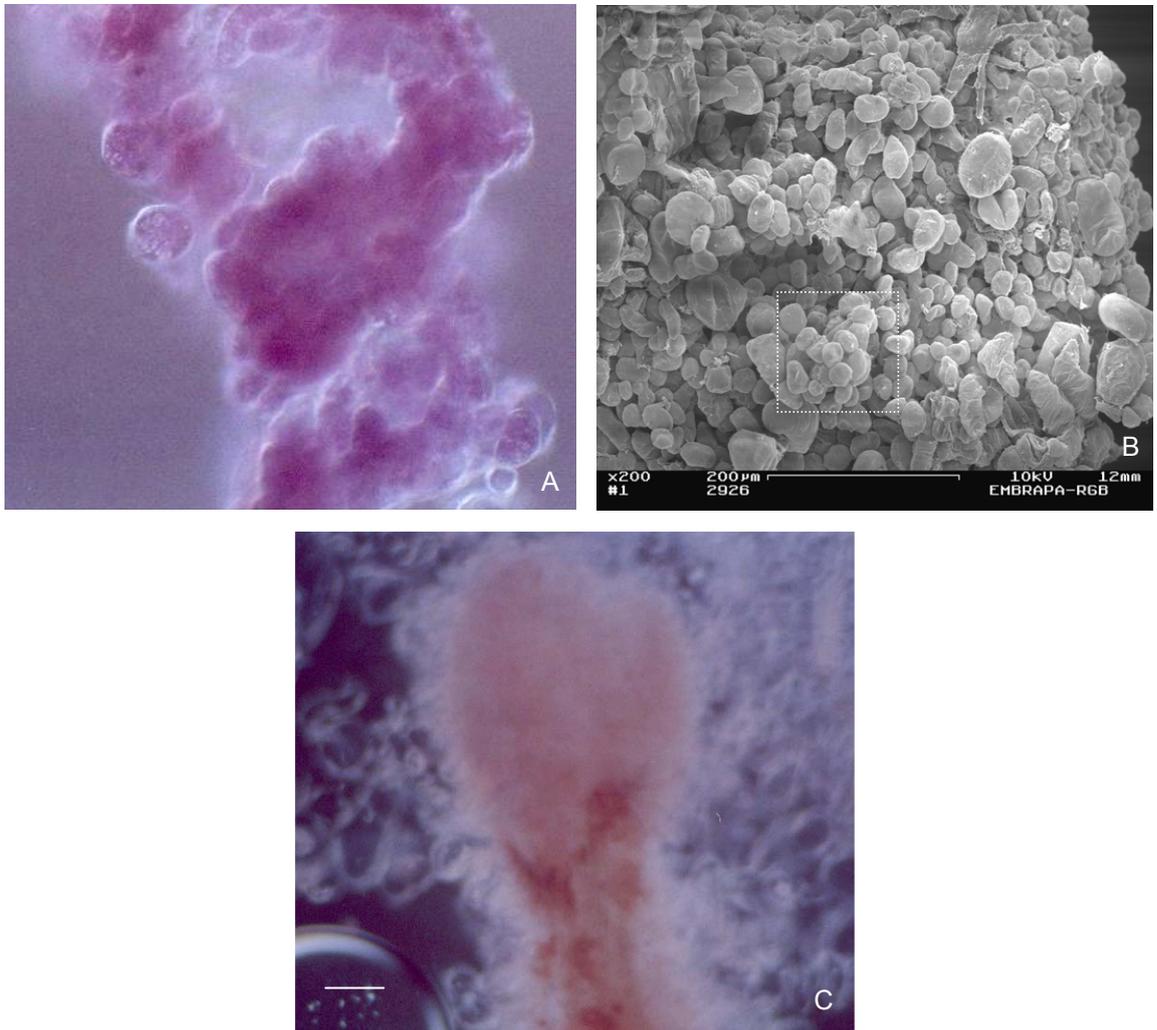


Figura 23 - Suspensão celular de *B. brizantha* cv. Marandu em meio MSCLind líquido. **A** - Grupo de células coradas com carmim acético e visualizadas em microscopia de luz. Barra =10,68 µm. **B** – micrografia eletrônica de varredura de suspensão celular evidenciando grupos de células viáveis para regeneração. barra = 200 µm. **C** - Embrião em cultura de suspensão celular corado com carmim acético e visualizado em microscopia de luz. Barra =13,35 µm.

Na regeneração das células em suspensão em meio MSCLreg sólido observou-se a formação homogênea de calos e diferenciação de embrião somático algumas vezes sem formação do escutelo e de forma mais sincronizada (Figura 24A e B),

aproximadamente 200 mg de células regeneraram 60 brotos (Figura 24C a F) quando em meio de regeneração.

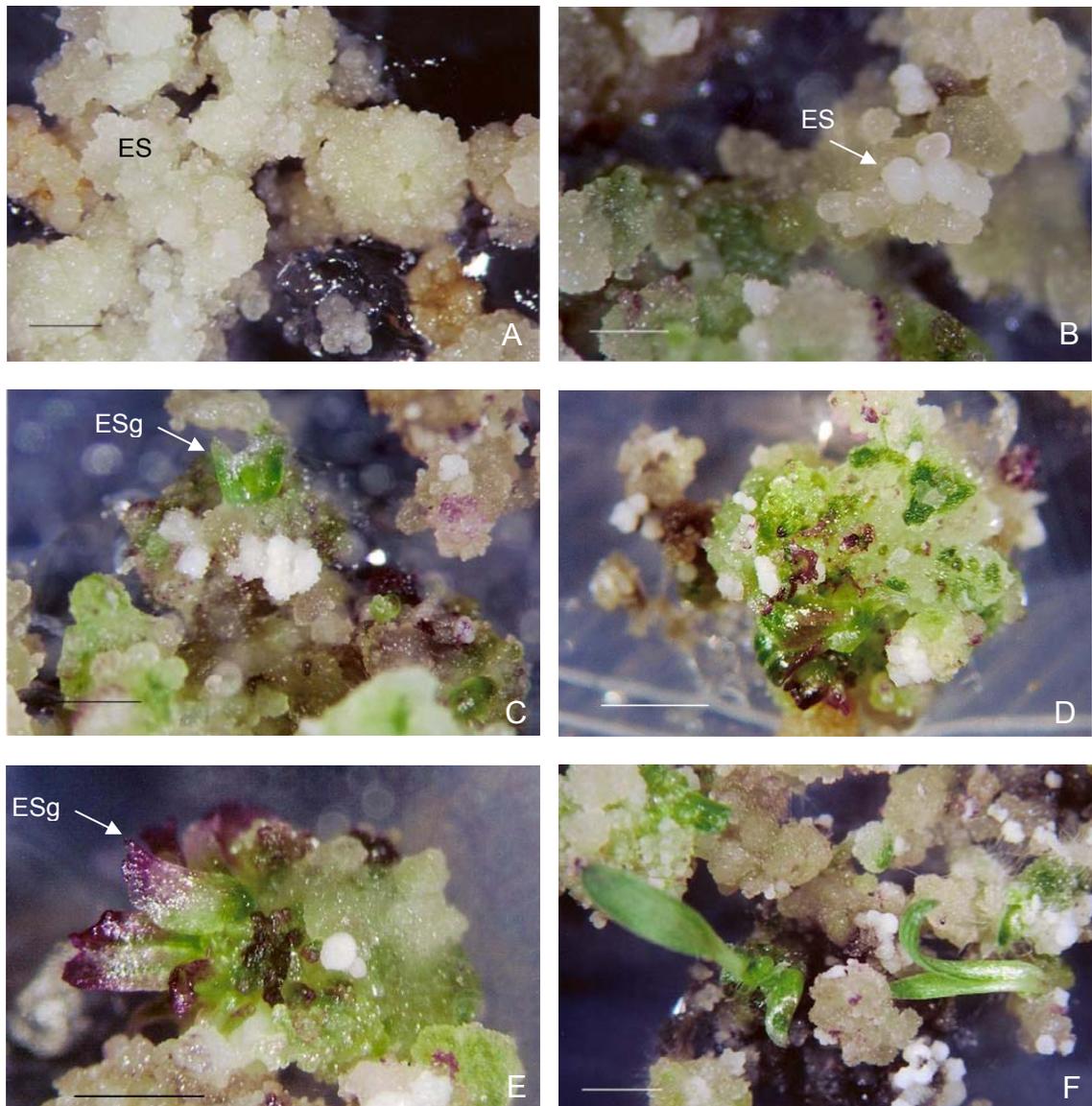


Figura 24 – Regeneração de suspensão celular em meio MSCLreg. **A e B** – Múltiplos embriões somáticos no estágio globular sem a formação de escutelo. barra \simeq 4,4 mm e 2,6 mm (respectivamente); **C a F** – Germinação de embriões somáticos. barra \simeq 4,4 mm, 6,6 mm, 4,4 mm e 6,6 mm (respectivamente). ES: embrião somático, ESg: embriões somáticos germinando.

Quando células em suspensão foram bombardeadas com pAHUG, as células pequenas, densas e arredondadas que são as viáveis para regeneração, apresentaram expressão do gene *gus*, enquanto as células vacuolizadas, não apresentaram expressão de *gus* (Figura 25).

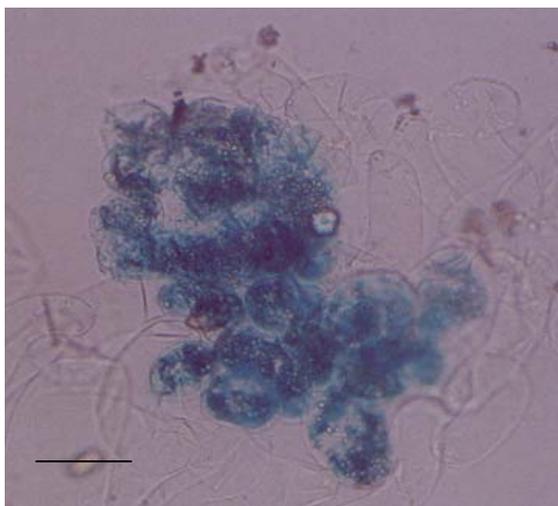


Figura 25 – Expressão do gene *gus* em grupo de células em suspensão de *B. brizantha* cv. Marandu, 48 horas após o bombardeamento de partículas, utilizando o vetor pAHUG. Barra 13,35 = μm .

5. DISCUSSÃO

Das seqüências de cDNA isoladas de ovários de *B. brizantha* por Differential Display-RT PCR - DDPCR, os clones, 04, 09, 21 e 45 apresentavam expressão tanto em ovários de plantas apomíticas (cv. Marandu) quanto de plantas sexuais (BRA 002747), na megasporogênese e megagametogênese. Entre estes, a expressão generalizada do clone 21 em ovários de plantas sexuais e apomíticas foi confirmada por *northern* reverso (Rodrigues et al., 2003).

Dado o interesse de se isolar seqüências de cDNA de expressão restrita a ovários visando posterior identificação de promotores, buscou-se caracterizar a tecido especificidade destes clones; Assim, foram realizadas análises por *northern* reverso com cDNA de anteras, ovários e folhas usando duas técnicas: dot-blot dos clones em plasmídeos em membranas e aplicação de produto de PCR das seqüências em gel com posterior transferência para a membrana. Comparando as duas técnicas de *northern* reverso usadas, o sinal se apresentou mais forte em membranas feitas a partir de gel de PCR, o que pode ser devido à amplificação dos fragmentos a serem hibridizados em relação ao dot-blot, onde estes encontram-se inseridos em plasmídeos. Expressão dos clones 04, 09 e 21 foi revelada por dot-blot em ovários e anteras e do clone 45 em todos os tecidos. Em ambas as técnicas o resultado da hibridização foi idêntico para os clones 09 e 21. Pela intensidade de hibridização destes clones nos tecidos reprodutivos de *B. brizantha* apomítica e sexual, estes foram escolhidos para caracterização por sequenciamento e busca de função em bancos de dados.

A seqüência de aminoácido deduzida do clone 09 apresentou similaridade com o *contig* 39 da biblioteca de *B. brizantha* apomítica e sexual e ambas seqüências, do clone 09 e *contig* 39, mostraram similaridade com a proteína ribossomal S8, que parece estar ligada à regulação da síntese de proteínas em células eucariotas (Nakamura et al., 1995). Em *E.coli* a S8 é uma proteína ribossomal regulatória da tradução de proteínas ribossomais codificadas no operon *spc* (Merianos et al., 2004).

A seqüência de aminoácido deduzida do clone 21 apresentou similaridade com os *contigs* 34 e 67 da biblioteca de *B. brizantha* apomítica. Apesar do clone 21 ter apresentado similaridade com a proteína ribossomal L41, os *contigs* 34 e 67 não

mostraram essa similaridade. A proteína ribossomal L41 quando está envolvida na síntese e processamento de proteínas em *Hordeum vulgare* (Abebe et al., 2004), e em *Gossypium hirsutum* pode ter papel estrutural nos ribossomos (Turley et al., 1994). As proteínas com as quais foi apontada similaridade em banco de dados, são proteínas envolvidas com síntese, processamento e regulação da tradução de proteínas ribossomais. A presença delas em ovários e anteras de *Brachiaria* tanto em acesso sexual como em apomítico, pode indicar um provável envolvimento na reprodução.

Foram realizadas tentativas de amplificação do clone 21 por 5'RACE sem sucesso. As seqüências de duas bandas repetidamente amplificadas em alta estringência foram analisadas e foi observado que os produtos eram inespecíficos ao gene estudado, mostrando que não houve sucesso na amplificação de seqüências específicas nas condições experimentais utilizadas. Problema na amplificação das bandas específicas pode ser devido aos iniciadores escolhidos, o desenho de novos iniciadores pode vir a otimizar a reação. Novos experimentos de 5'RACE deverão ser realizados para amplificação dessas seqüências aqui caracterizadas como específicas do sistema reprodutivo.

No presente trabalho, vários aspectos do processo de indução de embriogênese somática e regeneração de diferentes explantes usados no bombardeamento de partículas foram analisados visando melhor eficiência do sistema de transformação genética de *Brachiaria*.

Foi estabelecida uma coleção de plantas in vitro para servir como fonte de novos explantes, evitando problemas de contaminações endógenas de tecidos de *Brachiaria* sp. reportados em plantas de campo (http://www.cnpma.embrapa.br/projetos/endofiticos/resultados1/result_brachiaria.html; Dias-Filho, 1996).

Para o estabelecimento da coleção de *B. brizantha* in vitro os resultados indicaram que o melhor meio para induzir a micropropagação, comparando o meio contendo 3 ou 6 mg/L de cinetina, foi o meio contendo a mais alta concentração de cinetina testada, por induzir o maior número de brotos por segmento nodal. Altas concentrações de citocininas podem ser necessárias para induzir a resposta do explante na fase inicial e estabelecimento das culturas. As citocininas foram apontadas como indispensáveis para a quebra da dominância

apical e indução de proliferação de gemas axilares em diferentes culturas (Grattapaglia, 1998). Para a manutenção das plantas *in vitro*, verificou-se que o meio com baixas concentrações de auxinas, citocininas e giberelinas manteve as plantas vistosas por mais tempo em relação ao meio sem reguladores, indicando a necessidade de suplementação do meio com reguladores de crescimento para a manutenção *in vitro* das plantas a longo prazo. A adição de caseína e a menor concentração de sais e sacarose do meio MMP também podem influenciar positivamente na manutenção das plantas a longo prazo.

O sistema para transformação genética em *B. brizantha* é baseado em embriogênese somática que usa sementes maduras como explante original (Lenis, 1998; Lentini et al., 1999), o que limita os trabalhos com os acessos de baixa produção de sementes como o acesso sexual de *B. brizantha* (BRA 002747). Transformação genética com o acesso sexual é importante em trabalhos de expressão e regulação dos genes envolvidos com o tipo de reprodução, por isto, foi analisada a viabilidade de utilização dos segmentos basais das plantas *in vitro* para posterior transformação genética por biobalística. Estes explantes são interessantes por serem disponíveis ao longo do ano, e por permitir a pesquisa com acessos de baixa produção de sementes. Segmentos basais de *B. brizantha* foram anteriormente usados com sucesso em experimentos de micropropagação (Cabral et al., 2003b) e para duplicação cromossômica na presença de colchicina em *B. brizantha* diplóide sexual (BRA 002747 e BRA 003417) (Pinheiro et al., 2000). No entanto, para aplicação em processo de transformação por biobalística, análises da estrutura desses explantes indicaram restrições físicas pelo acesso reduzido ao meristema das gemas, que seria o alvo da transformação. Apesar da grande proliferação de gemas nesses segmentos basais em meio de micropropagação suas regiões meristemáticas não estão expostas, não sendo acessíveis às partículas durante o bombardeamento, por estarem envolvidos por muitas folhas. A exposição dos meristemas em explantes da base estolonífera das plantas é, portanto, um fator limitante para o processo de transformação genética. Uma outra alternativa para trabalhos de transformação genética e regeneração com o acesso sexual seria um sistema de transformação e regeneração baseado em cultura de tecidos de folhas jovens que vem sendo usado em milho com resultados positivos (Mohammad et al., 2006) onde

pequenos pedaços de folhas são usados na cultura de calos e esses usados para transformação por biobalística. Esse sistema será testado em nosso laboratório.

Dentro do sistema de embriogênese somática foram feitas análises de três diferentes explantes e suas condições de cultura para estudo da viabilidade de sua utilização na transformação genética por biobalística.

Os trabalhos foram iniciados com embriões isolados de sementes maduras em diferentes períodos de indução de embriogênese somática anterior ao bombardeamento, onde foi observado que embriões com cinco dias de cultura apresentavam maior expressão de *gus*. Esse resultado pode ser devido ao aumento da proliferação celular na região escutelar dos embriões entre três e cinco dias de indução em cultura, aumentando assim o número de células a serem transformadas, devido ao efeito da auxina 2,4-D. 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 que em embriões de *B. brizantha*, entre cinco e sete dias de cultura ocorre um aumento do volume das células devido à vacuolização, como observado por Lenis (1998). Esta vacuolização pode dificultar o acesso das partículas ao núcleo celular, reduzindo o número de células transformadas, acarretando na diminuição do número de embriões GUS positivo. A expressão do gene *gus* foi observada principalmente nas células do coleóptilo, não sendo observada em calos friáveis. 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, são essas células que apresentaram maior sinal de expressão de *gus*.

Quando avaliada a estabilidade do gene *gus*, embriões com três dias apresentaram maior expressão de *gus* e manutenção desta do que embriões com um dia, corroborando o experimento anterior onde foi visto que o período de cultivo do embrião anterior ao bombardeamento é importante para maior eficiência do processo de transformação. A manutenção da expressão no período de um a dez dias em embriões com três dias de cultivo pode ter ocorrido devido a uma maior proliferação celular nesses embriões antes do bombardeamento, conseqüentemente uma maior quantidade de células estaria disponível para transformação. No caso de embriões com um dia, esse período não foi suficiente para que ocorresse a proliferação celular anterior ao bombardeamento o que

acarretou em uma menor expressão no dia um, e uma maior redução da expressão dez dias após o bombardeamento. A diminuição da expressão aos 20 dias pode ser devida à expressão transiente do gene *gus*, como também à proliferação das células não transformadas, que são as células dos calos, que não apresentam expressão do gene *gus*. Ficou evidenciado que as células que foram transformadas de uma forma estável foram as da região do coleótilo do embrião apomítico onde não ocorre regeneração e proliferação celular, e sim um alongamento das células dessa região resultando no aspecto da expressão em formato de linhas.

Estes resultados apontaram a necessidade de estabelecimento de um sistema eficiente de transformação em células competentes para regeneração, assim como um sistema eficiente de seleção para favorecer a proliferação das células transformadas.

Calos embriogênicos foram analisados na busca de um explante mais adequado ao processo de transformação e regeneração dos tecidos bombardeados. Com esses explantes houve redução da contaminação e a possibilidade de produção em massa do explante a ser transformado. A regeneração a partir de calos embriogênicos estava estabelecida no laboratório e neste trabalho foram comparados o bombardeamento de embriões com o bombardeamento de calos embriogênicos (Santana, 2006; Cabral et al., 2006).

Durante o processo de indução e regeneração os calos embriogênicos mostraram uma grande heterogeneidade de tecidos produzidos o que dificulta a seleção dos explantes.

Multibrotações sobreviveram à seleção em dose elevada de higromicina 15 e 20 mg/L, mas, após serem individualizadas, os brotos não resistiram a esta dose de seleção após dez dias. Santana (2006) obteve três plântulas resistentes a 20mg/L de higromicina que foram transferidas para vermiculita, e dessas, apenas uma plântula foi PCR positiva para higromicina, indicando que 20mg/L de higromicina não é uma dose letal para brotos isolados. Da multibrotação inicial, apenas um broto era transformado, enquanto que os outros eram escapes. Apesar do gene *hptII* e do gene *gus* estarem no mesmo cassete (pAHUG), o gene *gus* não foi detectado por PCR na planta transformada. Os escapes, plantas que passaram pela seleção e sobreviveram apesar de não conterem o gene de resistência,

podem ter se desenvolvido devido à heterogeneidade de estágios de diferenciação dos tecidos e conseqüente resposta diferenciada ao agente seletivo ou ainda à uma “proteção” à exposição ao agente seletivo gerada pelos tecidos adjacentes ou quimeras, onde a regeneração da planta se dá a partir de células transformadas e de células não transformadas. No nosso caso, foi visto que a expressão de *gus* em embriões somáticos oriundos de calos embriogênicos bombardeados ocorreu no coleóptilo e no primórdio foliar que envolvem o meristema apical do embrião, além da região logo abaixo do meristema apical, no eixo embrionário; sendo o mesmo uma quimera, onde ao longo do desenvolvimento a GUS não foi detectada. Esta diversidade de estágios de diferenciação nos calos embriogênicos pode dificultar o processo de transformação e regeneração de plantas transformadas.

Em células embriogênicas de milho, tratamento osmótico, antes e após o bombardeamento, aumentou em mais de duas vezes a expressão transiente do gene *gus* (Philippe Vain, 1993). Tratamento osmótico anterior ou após o bombardeamento também vem sendo usado em *Paspalum notatum* Flugge (Smith et al., 2002) e *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. (Goldman et al., 2003) e *Dichanthium annulatum* (Dalton et al., 2003) sendo importante para o sucesso da transformação dessas monocotiledôneas. Assim, os calos embriogênicos de *Brachiaria* foram submetidos a tratamento osmótico. Com o tratamento osmótico em calos de *Brachiaria* em sacarose 12% anterior ao bombardeamento as células ficaram plasmolizadas, o que pode ocasionar maior exposição do núcleo e favorecimento de maior eficiência na transformação. No entanto, foram obtidas plantas a partir destes calos que embora sobreviventes à seleção em higromicina, quando individualizadas não sobreviveram. Calos embriogênicos bombardeados com pAct1-D e pAHC27 apresentaram expressão do gene *gus* 24 horas após o bombardeamento, no entanto, plântulas obtidas em meio MMP sem higromicina foram negativas tanto no ensaio histoquímico como na PCR para o gene *gus*, evidenciando a necessidade de seleção para plantas de *Brachiaria*.

Esses resultados sugerem que a obtenção de explantes mais homogêneos irá favorecer o processo de transformação genética e a seleção em higromicina. Em trabalhos de embriogênese somática repetitiva com calos de *B. brizantha* cv. Marandu foram obtidos calos embriogênicos homogêneos e de desenvolvimento

sincronizado, mas quando estes foram regenerados obteve-se embriões com anormalidades e retardo na elongação e germinação; os embriões somáticos que mantiveram a capacidade de regeneração produziram 100% de brotos albinos, indicando a inviabilidade desse sistema (Santana, 2006; Cabral et al., 2006).

Para obtenção de um sistema mais homogêneo e viável para transformação genética de *B. brizantha* via biobalística, células em suspensão foram obtidas a partir de calos embriogênicos. A suspensão celular foi estabelecida separadamente de calos friáveis e de massa branca compacta (escutelo do embrião somático), as células vindas de massa branca compacta apresentaram alta oxidação da cultura, o que pode ser devido à diferenciação da massa branca (escutelos) que quando colocada em meio na presença da auxina 2,4D, não apresentou capacidade de dediferenciação ou multiplicação de células meristemáticas. A liberação de compostos fenólicos pode causar a oxidação da cultura (Grattapaglia, 1998).

O efeito do pH na obtenção das culturas também foi avaliado e o melhor resultado foi com células cultivadas em meio de cultura mais ácido (pH 4.0). O pH dos meios de cultura é importante para obtenção de bons resultados em trabalhos de cultura de tecidos. O pH intracelular em plantas é alcalino e altamente regulado entre 7.4-7.5 (Gout et al., 1992). A regulação do pH intracelular é importante para a eficiência de reações enzimáticas e condutividade dos canais iônicos. Segundo Madshus (1988), dentro de uma faixa fisiológica o aumento do pH leva a um aumento das atividades metabólicas como aumento da síntese de DNA e RNA e o aumento do pH intracelular pode ter um papel significativo na indução da divisão celular. Além disso, quando há queda no pH extracelular ocorre uma resposta do canal antiporte Na^+/H^+ ocasionando uma grande entrada de Na^+ na célula. Com a abertura desse canal e o grande fluxo de entrada de Na^+ pode ocorrer um favorecimento do transporte de outros compostos para dentro da célula, como nutrientes e reguladores de crescimento o que poderia explicar a multiplicação das células, assim como a maior taxa de diferenciação da suspensão celular.

Outro fator de extrema importância é a concentração dos reguladores de crescimento nos meios de cultura. A redução da concentração da auxina 2,4D foi avaliada na regeneração da suspensão celular, com diminuição da proliferação de raízes e aumento da taxa de regeneração. Com o uso de 2,4D por um longo

período na fase de indução, quando os explantes são transferidos para o meio de regeneração com citocininas, o 2,4D remanescente nos explantes pode causar um desbalanço hormonal, dificultando o processo de regeneração e ocorrendo a proliferação de raízes. O uso de 2,4D é importante para a proliferação de calos na fase de indução dos explantes, mas durante a fase de regeneração o acúmulo de altas concentrações de 2,4D nas células pode inibir o desenvolvimento e a maturação do embrião somático após sua iniciação (Guerra et al., 1999).

Em coloração com carmim acético e em MEV foi observada a estrutura das células, onde pôde ser observado células com potencial embriogênético e a formação de embriões nessas culturas líquidas, e foi observada alta taxa de regeneração dessas células quando em meio de regeneração, indicando a viabilidade deste sistema para experimentos de transformação genética por biobalística. A expressão do gene repórter utilizado no bombardeamento destas células demonstrou que as células competentes para regeneração também o são para transformação genética.

Neste trabalho, vários aspectos do processo de indução de embriogênese somática e regeneração dos diferentes explantes usados no bombardeamento de partículas foram analisados visando melhor eficiência do sistema de transformação genética de *Brachiaria brizantha*. De acordo com todos os resultados, as células em suspensão quando cultivadas em pH 4.0 e em meio com baixas concentrações de auxina anterior ao meio de regeneração, mostraram os melhores resultados quanto à homogeneidade de estruturas, e a formação de embriões assim como a germinação desses. Esses resultados indicam maior viabilidade deste sistema para obtenção de uma metodologia eficiente de transformação genética para *Brachiaria brizantha*. Células em suspensão poderão, futuramente, ser usadas na transformação genética por biobalística em trabalhos de expressão e regulação de genes envolvidos com a reprodução em *Brachiaria brizantha*.

6. CONCLUSÕES

Os cDNA dos clones 09 e 21 apresentam expressão específica em ovários e anteras e similaridade de seqüências com proteínas ribossomais de cevada, algodão, arroz, milho e tabaco. Ambos os clones estão presentes em bibliotecas de EST de ovário de *B. brizantha*.

A suspensão celular de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu está bem estabelecida e foi determinada como o melhor explante para transformação genética por biobalística por apresentar melhor acesso às micropartículas de bombardeamento, homogeneidade de estruturas, e a indução e germinação de embriões sincronizados. As células transformadas apresentam competência para regeneração.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEBE, T.; SKADSEN, R. W. ; KAEPLER, H. F. Cloning and identification of highly expressed genes in barley lemma and palea. **Crop Science**, v.44, n.3, p.942-950, 2004.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. ; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucl. Acids Res.**, v.25, n.17, p.3389-3402, 1997.

ALVES, E. R.; CARNEIRO, V.T.C. ; ARAUJO, A.C.G. Direct evidence of pseudogamy in an apomictic *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Sexual Plant Reproduction**, v.14, n.4, p.207-212, 2001.

ARAGÃO, F. J. L. ; RECH, E. L. Morphological factors influencing recovery of transgenic bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) of a Carioca cultivar. **International Journal of Plant Sciences**, v.158, n.2, p.157-163, 1997.

ARAUJO, A. C. G.; FALCÃO, R. ; CARNEIRO, V. T. C. Seed abortion in the sexual counterpart of *Brachiaria brizantha* apomicts (Poaceae). **Sexual Plant Reproduction**, v. in press, 2007.

ARAUJO, 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 Végétales - Le Botaniste Tome**, v.XXIII, n.1-2, p.13-28, 2000.

ARAUJO, A. C. G.; NOBREGA, J. M.; POZZOBON, M. T. ; CARNEIRO, V. T. C. Evidence of sexuality in *Brachiaria brizantha* (Poaceae) artificial tetraploid plants and progeny. **Euphytica**, v.144, n.1-2, p.39-50, 2005.

ASHOK, C. ; RONGDA, Q. Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf-type bermudagrass: Effect of 6-benzyladenine in callus induction medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.60, n.2, p.113-120, 2000.

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

BARROS, L. M. G. ; CARNEIRO, V. T. C. Eletroporação de protoplastos. In: A. C. M. Brasileiro e V. T. C. Carneiro (Ed.). **Manual de Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa- SPI, v.1, 1998. Eletroporação de protoplastos, p.35-47

BERGER, S. L. Preparation and characterization of RNA: overview. In: (Ed.). **Guide to Molecular cloning techniques**. San Diego, California, v.152, 1987. (Methods in Enzymology)

BICKNELL, R. A. ; KOLTUNOW, A. M. Understanding apomixis: recent advances and remaining conundrums. **The Plant Cell**, v.16, p.S228-S245, 2004.

BOURGIN, J. P.; CHUPEAU, Y. ; MISSONIER, C. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of several *Nicotiana* species. **Physiol. Plant.**, v.45, p.288-292, 1979.

BOWER, R. ; BIRCH, R. G. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. **The Plant Journal**, v.2, n.3, p.409-416, 1992.

BRASILEIRO, A. C. M. ; CARNEIRO, V.T.C., Eds. **Manual de Transformação Genética de Plantas**. Brasília - DF: EMBRAPA-SPI, v.01, p.309, 1ed. 1998.

BURKE, T. J.; CALLIS, J. ; VIESTRA, R. D. Characterization of a polyubiquitin gene from *Arabidopsis thaliana*. **Molecular and General Genetics**, v.213, p.435-443, 1988.

CABRAL, G. B.; CARNEIRO, V. T. C.; SANTANA, C. G.; LEITE, J. A.; PIRES, M. V. V.; DUSI, D. M. A. Prospecção de cepas de *Agrobacterium* spp. para a transformação genética de Braquiária. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento Embrapa**, v.115, p.1-17, 2005.

CABRAL, G. B.; LACERDA, A. L. M.; PIRES, M. V. V.; RODRIGUES, J. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. **Expressão do gene *gus* em diferentes explantes de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu**. XIV Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais I Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas. Lavras-MG, 2003a. 431-431 p.

CABRAL, G. B.; PIRES, M. V. V.; LACERDA, A. L. M. ; CARNEIRO, V. T. C. Introdução in vitro, micropropagação e conservação de plantas de *Brachiaria* sp. **Comunicado Técnico Embrapa**, v.101, dezembro 2003, p.1-4, 2003b.

CABRAL, G. B.; SANTANA, C.G.; CARNEIRO, V.T.C.; MATSUMOTO, K. Ocorrência de Albinismo em embriogênese somática repetitiva em *Brachiaria brizantha*. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006 **Boletim de Pesquisa**, 160

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P. ; FERREIRA, M. E. Meios Nutritivos. In: E.-S. Embrapa-Cnph (Ed.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília, v.1, 1998, p.508

CARMAN, J. G. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony. **Biological-Journal-of-the-Linnean-Society**, v.61, n.1, p.51-94, 1997.

CARNEIRO, V. T. C.; CABRAL, G. B.; RODRIGUES, J. C. M. ; DUSI, D. M. A. Transformação de plantas apomíticas. In: V. T. C. Carneiro e D. M. A. Dusi (Ed.). **Clonagem de plantas por sementes: estratégias de estudo da apomixia**. Brasília - DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004, p.101-112

CARNEIRO, V. T. C. ; DUSI, D. M. A. Apomixia: em busca de tecnologias de clonagem de plantas por sementes. **Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.25, n.março/abril, p.36-42, 2002.

CARNEIRO, V. T. C. ; DUSI, D. M. A. Descrição dos tipos de apomixia. In: V. T. C. Carneiro e D. M. A. Dusi (Ed.). **Clonagem de plantas por sementes: estratégias de estudo da apomixia**. Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. Descrição dos tipos de Apomixia, p.15-18.

CARNEIRO, V. T. C.; DUSI, D. M. A. ; ORTIZ, J. P. A. Apomixis: occurrence, applications and improvements. In: (Ed.). **Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology**, Global Science Books, v.1, 2006.

CASAS, A. M.; KONONOWICZ, A. K.; ZEHR, U. B.; TOMES, D. T.; AXTELL, J. D.; BUTLER, L. G.; BRESSAN, R. A. ; HASEGAWA, P. M. Transgenic sorghum plants via microprojectile bombardment. **PNAS**, v.90, n.23, p.11212-11216, 1993.

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**, v.5, p.213-218, 1996.

CHRISTENSEN, A. H.; SHARROCK, R. A. ; QUAIL, P. H. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. **Plant Molecular Biology**, v.18, n.4, p.675-689, 1992.

CHRISTOU, P.; FORD, T. L. ; KOFRON, M. Production of transgenic rice (*Oryza sativa L.*) Plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. **Bio/Technology**, v.9, p.957-962, 1991.

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**, v.21, n.10, p.974-980, 2003.

DIAS-FILHO, M. B.; RODRIGUES, K. F. Fungal endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizantha* cv. Marandu e *B. humidicola*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.31, n.12, p.905-909, 1996.

DUJARDIN, M. ; HANNA, W. Microsporogenesis, reproductive behavior, and fertility in five *Pennisetum* species. **Theoretical and Applied Genetics**, v.67, n.2, p.197-201, 1984.

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

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C. ; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. accuracy assessment. **Genome Res.**, v.8, n.3, p.175-185, 1998.

FISCHER-IGLESIAS, C.; SUNDBERG, B.; NEUHAUS, G. ; JONES, A. M. Auxin distribution and transport during embryonic pattern formation in wheat. **The Plant Journal**, v.26, n.2, p.115-129, 2001.

FISCHER, C.; SPETH, V.; FLEIG-EBERENZ, S. ; NEUHAUS, G. Induction of zygotic polyembryos in wheat: influence of auxin polar transport. **Plant Cell**, v.9, n.10, p.1767-1780, 1997.

FOSKET, D. E. **Plant growth and development : a molecular approach**. San Diego, California: Academic Press. 1994. 580 p,

FRAME, B. R.; SHOU, H.; CHIKWAMBA, R. K.; ZHANG, Z.; XIANG, C.; FONGER, T. M.; PEGG, S. E. K.; LI, B.; NETTLETON, D. S.; PEI, D. ; WANG, K. *Agrobacterium tumefaciens*- mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system. **Plant Physiol.**, v.129, p.13-22, 2002.

GASSER, C. S.; FRALEY, R. T. Genetically Engineering Plants for Crop Improvement. **Science**, v.244, p.1293-1299, 1989.

GAMA, M. I. C. S. Identificação de plantas transgênicas por PCR. In: A. C. M. Brasileiro e V. T. C. Carneiro (Ed.). **Manual de Transformação Genética de Plantas**. Brasília-DF: Embrapa- SPI/ Embrapa-Cenargen 1998. Identificação de Plantas Transgênicas por PCR, p.309

GARDINER, J.; SCHROEDER, S.; POLACCO, M. L.; SANCHEZ-VILLEDA, H.; FANG, Z.; MORGANTE, M.; LANDEWE, T.; FENGLER, K.; USECHE, F.; HANAFEY, M.; TINGEY, S.; CHOU, H.; WING, R.; SODERLUND, C. ; COE, E. H., JR. Anchoring 9,371 maize expressed sequence tagged unigenes to the bacterial artificial chromosome contig map by two-dimensional overgo hybridization. **Plant Physiol.**, v.134, n.4, p.1317-1326, 2004.

GARG, A. K.; KIM, J.-K.; OWENS, T. G.; RANWALA, A. P.; CHOI, Y. D.; KOCHIAN, L. V. ; WU, R. J. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. **PNAS**, v.99, n.25, p.15898-15903, 2002.

GOLDMAN, J. J.; HANNA, W. W.; FLEMING, G. ; OZIAS-AKINS, P. Fertile transgenic pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] plants recovered through microprojectile bombardment and phosphinothricin selection of apical meristem-, inflorescence-, and immature embryo-derived embryogenic tissues. **Plant Cell Reports**, v.21, n.10, p.999-1009, 2003.

GORDON-KAMM, W. J.; SPENCER, T. M.; MANGANO, M. L.; ADAMS, T. R.; DAINES, R. J.; START, W. G.; O'BRIEN, J. V.; CHAMBERS, S. A.; ADAMS JR, W. R.; WILLETTS, N. G.; RICE, T. B.; MACKEY, C. J.; KRUEGER, R. W.; KAUSCH, A. P. ; LEMAUX, P. G. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. **Plant Cell**, v.2, n.7, p.603-618, 1990.

GOULD, J.; DEVEY, M.; HASEGAWA, O.; ULIAN, E. C.; PETERSON, G. ; SMITH, R. H. Transformation of *Zea mays* L. using *Agrobacterium tumefaciens* and the shoot apex. **Plant Physiol.**, v.95, n.2, p.426-434, 1991.

GOUT, E.; BLIGNY R.; DOUCE, R. Regulation of intracellular pH values in higher plant cells carbon-13 and phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies. **The Journal of Biological Chemistry** v.267, n.20, p.13903-13909, 1992.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: E.-S. Embrapa-Cnph (Ed.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília, v.1, 1998. Micropropagação, p.508

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C. ; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: E.-S. Embrapa-Cnph (Ed.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas** Brasília, v.2, 1999. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas, p.533-568

GUILLEY, H.; DUDLEY, R. K.; JONARD, G.; BALAZS, E. ; RICHARDS, K. E. Transcription of cauliflower mosaic virus DNA: detecion of promoter sequences, and characterization of transcription. **Cell**, v.30, p.763-773, 1982.

HAAS, B.; VOLFOVSKY, N.; TOWN, C.; TROUKHAN, M.; ALEXANDROV, N.; FELDMANN, K.; FLAVELL, R.; WHITE, O. ; SALZBERG, S. Full-length messenger RNA sequences greatly improve genome annotation. **Genome Biology**, v.3, n.6, p.research0029.1 - research0029.12, 2002.

HAMBLIN, M. T.; CASA, A. M.; SUN, H.; MURRAY, S.C.; PATERSON, A.H.; AQUADRO, C. F.; KRESOVICH S. Challenges of detecting directional selection after a bottleneck: lessons from *Sorghum bicolor*. **Genetics**, v.173, n.2, p. 953-964, 2006.

HANNA, W. W. ; BASHAW, E. C. Apomixis : its identification and use in plant breeding. **Crop Science**, v.27, p.1136-1139, 1987.

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

HU, T.; METZ, S.; CHAY, C.; ZHOU, H. P.; BIEST, N.; CHEN, G.; CHENG, M.; FENG, X.; RADIONENKO, M.; LU, F. ; FRY, J. *Agrobacterium*-mediated large-scale transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) using glyphosate selection. **Plant Cell Reports**, v.21, n.10, p.1010-1019, 2003.

INTERNATIONAL RICE GENOME SEQUENCING PROJECT. The map-based sequence of the rice genome. **Nature**, v.436, n.7052, p.793-800, 2005

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

JIA, J.; FU, J.; ZHENG, J.; ZHOU, X.; HUAI, J.; WANG, J.; WANG, M.; ZHANG, Y.; CHEN, X.; ZHANG, J.; ZHAO, J.; SU, Z.; LV, Y. ; WANG, G. Annotation and expression profile analysis of 2073 full-length cDNAs from stress-induced maize (*Zea mays* L.) seedlings. **The Plant Journal**, v.48, n.5, p.710-727, 2006.

JOSHI, M. ; DHAR, U. In vitro propagation of *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew. – an endangered ethnoreligious medicinal herb of Himalaya. **Plant Cell Reports**, v.21, p.933-939, 2003.

JUNQUEIRA, L. C. ; CARNEIRO, J. Tecnologia da biologia celular e molecular: alguns exemplos. **Biologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro, 1997. Tecnologia da Biologia Celular e Molecular: Alguns Exemplos, p.299

KELLER-GREIN, G.; MAASS, B. L. ; HANSON, J. Natural variation in *Brachiaria* and existing germplasm collections. In: (Ed.). **Brachiaria: Biology, Agronomy and Improvement**. Cali, Colombia: CIAT, v.1, 1996. Natural variation in *Brachiaria* and existing germplasm collections, p.258

KIKUCHI, S.; SATOH, K.; NAGATA, T.; KAWAGASHIRA, N.; DOI, K.; KISHIMOTO, N.; YAZAKI, J.; ISHIKAWA, M.; YAMADA, H.; OOKA, H.; HOTTA, I.; KOJIMA, K.; NAMIKI, T.; OHNEDA, E.; YAHAGI, W.; SUZUKI, K.; LI, C. J.; OHTSUKI, K.; SHISHIKI, T.; OTOMO, Y.; MURAKAMI, K.; IIDA, Y.; SUGANO, S.; FUJIMURA, T.; SUZUKI, Y.; TSUNODA, Y.; KUROSAKI, T.; KODAMA, T.; MASUDA, H.; KOBAYASHI, M.; XIE, Q.; LU, M.; NARIKAWA, R.; SUGIYAMA, A.; MIZUNO, K.; YOKOMIZO, S.; NIIKURA, J.; IKEDA, R.; ISHIBIKI, J.; KAWAMATA, M.; YOSHIMURA, A.; MIURA, J.; KUSUMEGI, T.; OKA, M.; RYU, R.; UEDA, M.; MATSUBARA, K.; KAWAI, J.; CARNINCI, P.; ADACHI, J.; AIZAWA, K.; ARAKAWA, T.; FUKUDA, S.; HARA, A.; HASHIDUME, W.; HAYATSU, N.; IMOTANI, K.; ISHII, Y.; ITOH, M.; KAGAWA, I.; KONDO, S.; KONNO, H.; MIYAZAKI, A.; OSATO, N.; OTA, Y.; SAITO, R.; SASAKI, D.; SATO, K.; SHIBATA, K.; SHINAGAWA, A.; SHIRAKI, T.; YOSHINO, M.; HAYASHIZAKI, Y. Collection, mapping, and annotation of over 28,000 cDNA clones from japonica rice. **Science**, v.301, n.5631, p.376-379, 2003.

KOLTUNOW, A. M.; BICKNELL, R. A.; CHAUDHURY, A. M. Apomixis: molecular strategies for the Generation of genetically identical seeds without fertilization. **Plant Physiol.**, v.108, p.1345-1352, 1995.

KOLTUNOW, A., M.; JOHNSON, S., D.; LYNCH, M.; YOSHIHARA, T.; COSTANTINO, P. Expression of rolB in apomictic *Hieracium piloselloides* Vill. causes ectopic meristems in planta and changes in ovule formation, where apomixis initiates at higher frequency. **Planta**, v.214, n.2, p.196-205, 2001.

KUMAR, K. K.; MARUTHASALAM, S.; LOGANATHAN, M. ; SUDHAKAR, D. An improved *Agrobacterium*-mediated transformation Pprotocol for recalcitrant elite indica rice cultivars. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.23, p.67–73, 2005.

LAPOINTE, S. L. ; MILES, J. W. Germplasm case study : *Brachiaria* species. In: Ciat (Ed.). **Pastures for the tropical lowlands**, 1992. Germplasm case study : *Brachiaria* species, p.43-55

LENIS, MANZANO, S. J. **Desenvolvimento de um método de transformação genética de *Brachiaria* spp, por bombardeamento de partículas.** (Mestrado em Biologia Molecular). Universidade de Brasilia, 1998. 131p.

LENTINI, Z.; CARNEIRO, V. T. C.; MANZANO, S. J. L. ; GALINDO, L. **Processo de Regeneração de Plantas e Transformação Genética de espécies de *Brachiaria*.** Brasil: CIAT-Colômbia, Embrapa-Brasil. PI 9903700-9 1999.

LINSMAIER, E. M. ; SKOOG, F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture. **Physiol. Plant**, v.18, p.100-127, 1965.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. Biomembranas e organização subcelular das células eucarióticas. In: E. R. Ltda. (Ed.). **Biologia Celular e Molecular.** Rio de Janeiro, 2002. Biomembranas e Organização Subcelular das Células Eucarióticas, p.1084

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

MALIGA, P. Plastid transformation in higher plants. **Annual Review of Plant Biology**, v.55, n.1, p.289-313, 2004.

MARTON, M. L.; CORDTS, S.; BROADHVEST, J. ; DRESSELHAUS, T. Micropylar pollen tube guidance by egg apparatus 1 of maize. **Science**, v.307, n.5709, p.573-576, 2005.

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

MATZK, F.; PRODANOVIC, S.; BAUMLEIN, H.; SCHUBERT, I. The inheritance of apomixis in *Poa pratensis* confirms a five locus model with differences in gene expressivity and penetrance. **Plant Cell**, v.17, n.1, p.13-24, 2005.

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

MERIANOS, H. J.; WANG, J. ; MOORE, P. B. The structure of a ribosomal protein S8/spc operon mRNA complex. **RNA**, v.10, n.6, p.954-964, 2004.

MILES, J. W.; MAASS, B. L. ; VALLE, C. B. D. **Brachiaria: Biology, Agronomy and Improvement**. Cali, Colombia: CIAT, v.1. 1996. 258 p,

MOHAMMAD, A.; STEPHANIE, R. ; RALPH, B. A leaf-based regeneration and transformation system for maize (*Zea mays* L.). **Transgenic Research**. On line, 2006

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

MUTHAN, B.; RATHORE, T. S. ; RAI, V. R. Micropropagation of an endangered Indian sandalwood (*Santalum album* L.). **Journal of Forest Research**, v.11, p.203-209, 2006.

NAKAMURA, I.; KAMEYA, N.; AOKI, T.; TADA, T.; NORITA, E.; KANZAKI, H.; UCHIMIYA, H. Nucleotide sequence of a rice cDNA encoding a homolog of the eukaryotic ribosomal protein S8. **Plant Physiol.**, v.107, n.4, p.1463-1464, 1995.

NEGROTTO, D.; JOLLEY, M.; BEER, S.; WENCK, A. R.; HANSEN, G. The use phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. **Plant Cell Reports**, v.19, p.798-803, 2000.

NOGLER, G. A. Gametophytic apomixis. In: B. M. Johri (Ed.). **Embriology of Angiosperms**. Berlin: Springer-Verlag, 1984. Gametophytic apomixis, p.475-518

NUNES, S. G. ***Brachiaria brizantha* cv. Marandu**. Campo Grande, MS: Embrapa-CNPGC, v.21, p.31p., 1984.

PATI, P. K.; RATH, S. P.; SHARMA, M.; SOOD, A. ; AHUJA, P. S. In vitro propagation of rose - a review. **Biotechnology Advances**, v.24, n.1, p.94-114, 2006.

PESSINO, S. C.; EVANS, C.; ORTIZ, J. P. A.; ARMSTEAD, I.; VALLE, C. B.; HAYWARD, M. D. A genetic map of the apospory-region in *Brachiaria* hybrids: identification of the two markers closely associated with the trait. **Hereditas**, v.128, p.153-158, 1998.

PESSINO, S. C.; ORTIZ, J. P. A.; LEBLANC, O.; VALLE, C. B. D.; EVANS, C.; HAYWARD, M. D. Identification of a maize linkage group related to apomixis in *Brachiaria*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.94, n.3-4, p.439-444, 1997.

PHILIPPE VAIN, M. D. M.; FINER, J. J. Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. **Plant Cell Reports**, v.12, n.2, p.84-88, 1993.

PINHEIRO, A. A.; POZZOBON, M. T.; 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**, v.19, n.3, p.274-278, 2000.

POLAQUINI, L. E. M.; SOUZA, J. G., GEBARA, J. J. Transformações técnico-produtivas e comerciais na pecuária de corte brasileira a partir da década de 90. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.1, p.321-327, 2006.

POTRYKUS, I. Gene transfer to plants: assessment and perspectives. **Physiologia Plantarum**, v.79, n.1, p.125-134, 1990.

QUARIN, C. L.; FRANCISCO, E.; ERIC, J. M.; SILVINA, C. P. ; OSCAR, A. B. A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. **Sexual Plant Reproduction**, v.13, n.5, p.243-249, 2001.

RAKOCZY-TROJANOWSKA, M. Alternative methods of plant transformation – a short review. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v.7, p.849-858, 2002.

RATNASIRI, M.; RAYMOND, M. W. F.; IONA, W.; HONG, D.; JOANNE, L. S.; ANDREW, C. A. Efficient transient transformation of suspension culture-derived apple protoplasts. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.70, n.1, p.77-82, 2002.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v.único. 1996. 728 p

RECH, E. L.; ARAGÃO, F. J. L. Biobalística. In: A. C. M. Brasileiro e V. T. C. Carneiro (Ed.). **Manual de Transformação Genética de Plantas**. Brasília-DF: Embrapa- SPI, v.1, 1998. Biobalística, p.51-64

RENVOIZE, S. A.; CLAYTON, W. D. ; KABUYE, C. H. S. Morphology, taxonomy, and natural distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb. In: (Ed.). **Brachiaria: Biology, Agronomy and Improvement**. Cali, Colombia: CIAT, v.1,

1996. Morphology, taxonomy, and natural distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb, p.258

RITALA, A.; ASPEGREN, K.; KURTÉN, U.; SALMENKALLIO-MARTILA, M.; MANNONEN, L.; HANNUS, R.; KAUPPIEN, V.; TEERI, T. H. ; ENARI, T. Fertile transgenic barley by particle bombardment of immature embryos. **Plant Molecular Biology**, v.24, p.317-325, 1994.

RODRIGUES, J. C. M.; CABRAL, G. B.; DUSI, D. M. A.; MELLO, L. V.; RIGDEN, D.; CARNEIRO, V. T. C. Identification of differentially expressed cDNA sequences in ovaries of sexual and apomictic plants of *Brachiaria brizantha*. **Plant Molecular Biology**, v.53, 2004, p.745-757, 2003.

RODRIGUEZ, A. P. M.; FILIPPI, S. B. ; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Histological changes in banana explants, cv. Nanicão (*Musa* spp., Group AAA), submitted to different auxins for induction of somatic embryogenesis. **Revista Brasil. Bot.**, v.24, n.4 (suplemento), dezembro, p.595-602, 2001.

ROMANO, E. Análise da integração do DNA pela técnica *southern Blot*. In: A. C. M. Brasileiro e V. T. C. Carneiro (Ed.). **Manual de Transformação Genética de Plantas** Brasília -DF: Embrapa- SPI/ Embrapa-Cenargen 1998. Análise da integração do DNA pela técnica *southern Blot*, p.309

SANFORD, J. C. Biolistic plant transformation. **Physiologia Plantarum**, v.79, p.206-209, 1990.

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

SANFORD, J. C.; SMITH, F. ; RUSSELL, J. Optimizing the biolistic process for different biological applications. **Methods in Enzimology**, v.217, p.483-509, 1993.

SANTANA, C. G. **Regeneração e Transformação Genética de *Brachiaria brizantha* via Biobalística.** (Monografia). Ciências Biológicas, Faculdades Integradas da Terra de Brasília - FTB, Brasília, 2006. 33 p.

SAVIDAN, Y. H. Embryological analysis of facultative apomixis in *Panicum maximum* Jacq. **Crop Science**, v.22, p.467-469, 1982.

SAVIDAN, Y. H. Apomixis: Genetics and Breeding. **Plant Breeding Reviews**, v.18, p.13-86, 2000.

SHARP, W. R.; SONDAHL, M. R.; CALDAS, L. S.; MARAFFA, S. B. The physiology on in vitro asexual embryogenesis. **Horticultural Review**, v.2, p. 268-310, 1980.

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

SKOOG, F. ; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. **Symp. Soc. Exp. Biol.**, v.11, p.118-231, 1957.

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

SPELLANE, C.; CURTIS, M. D. ; GROSSNIKLAUS, U. Apomixis technology development - virgin births in farmers' fields? **Nature Biotechnology**, v.22, n.6, p.687-691, 2004.

THOMAS, T. L. ; HALL, T. C. Gene transfer and expression in plants: Implications and potential. **BioEssays**, v.3, n.4, p.149-153, 1985.

TINGAY, S.; MCELROY, D.; KALLA, R.; FIEG, S.; WANG, M.; THORNTON, S.; BRETELL, R. *Agrobacterium*-mediated barley transformation. **The Plant Journal**, v.11, n.6, p.1369-1376, 1997.

TOGAWA, R. C. ; BRIGIDO, M. M. **PHPH: Web based tool for simple electropherogram quality analysis**. 1st International Conference on Bioinformatics and Computational Biology, IcoBiCoBi. Ribeirão Preto, 2003. p.

TOHME, J.; PALACIOS, N.; LENIS, S. ; ROCA, W. Applications of biotechnology to *Brachiaria*. In: J. W. Miles, B. L. Maass, *et al* (Ed.). **Brachiaria: Biology, agronomy and improvement**. Cali- Colombia: CIAT-EMBRAPA, 1996. Applications of biotechnology to *Brachiaria*, p.196-204

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. **Plant Cell**, v.15, n.7, p.1524-1537, 2003.

TURLEY, R. B.; FERGUSON, D. L. ; MEREDITH JR, W. R. Isolation and characterization of a cDNA encoding ribosomal protein L41 from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Plant Physiology**, v.105, n.4, p.1449-1450, 1994.

VALLE, C. B. D. Avaliação de germoplasma e melhoramento genético de braquiárias. In: V. T. E. A. Paulino (Ed.). **Encontro para discussão sobre espécies do gênero *Brachiaria***. Nova Odessa, v.2, 1991. Avaliação de germoplasma e melhoramento genético de braquiárias, p.301-342

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

VALLE, C. B. D.; JANK, L.; RESENDE, R. M. S. ; CANÇADO, L. J. **O papel da biotecnologia de forrageiras para a produção animal.** Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 41. Campo Grande, 2004b.

VALLE, C. B. D. ; MILES, J. W. Melhoramento de gramíneas do gênero *Brachiaria*. In: A. M. Peixoto, J. C. D. Moura, *et al* (Ed.). **XI Simpósio sobre manejo de pastagem.** Piracicaba, SP, Brasil.: FEALQ, v.23, 1994. Melhoramento de gramíneas do gênero *Brachiaria*.

VALLE, C. B. D. ; SAVIDAN, Y. Genetics, cytogenetics and reproductive biology of *Brachiaria*. In: J. W. Miles, B. L. Maass, *et al* (Ed.). ***Brachiaria: Biology, agronomy and improvement.*** Cali- Colombia: CIAT-EMBRAPA, 1996. Genetics, cytogenetics and reproductive biology of *Brachiaria*, p.288

VASIL, V.; SRIVASTAVA, V.; CASTILLO, A. M.; FROMM, M. E. ; VASIL, I. K. Rapid production of transgenic wheat plants by direct bombardment of cultured immature embryos. **Nature Biotechnology**, v.11, n.12, p.1553-1558, 1993.

VERDAGUER, B.; KOCHKO, A.; BEACHY, R., N. ; FAUQUET, C. Isolation and expression in transgenic tobacco and rice plants, of the cassava vein mosaic virus (CVMV) promoter. **Plant Molecular Biology**, v.31, n.6, p.1129-1139, 1996.

XUE, G. P.; PATEL, M.; JOHNSON, J. S.; SMYTH, D. J. ; VICKERS, C. E. Selectable marker-free transgenic barley producing a high level of cellulase (1,4- β -glucanase) in developing grains. **Plant Cell Reports**, v.V21, n.11, p.1088-1094, 2003.

YONG-QIANG, A.; MCDOWELL, J. M.; HUANG, S.; MCKINNEY, E. C.; CHAMBLISS, S.; MEAGHER, R. B. Strong, constitutive expression of the *Arabidopsis* ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. **The Plant Journal**, v.10, n.1, p.107-121, 1996.

ZUO-YU, Z.; TISHU, C.; LAURA, T.; MIKE, M.; NING, W.; HONG, P.; MARJORIE, R.; SHERYL, S.; DAVE, H.; JON, S. ; DORTIE, P. *Agrobacterium*-mediated *sorghum* transformation. **Plant Molecular Biology**, v.44, n.6, p.789-798, 2000.