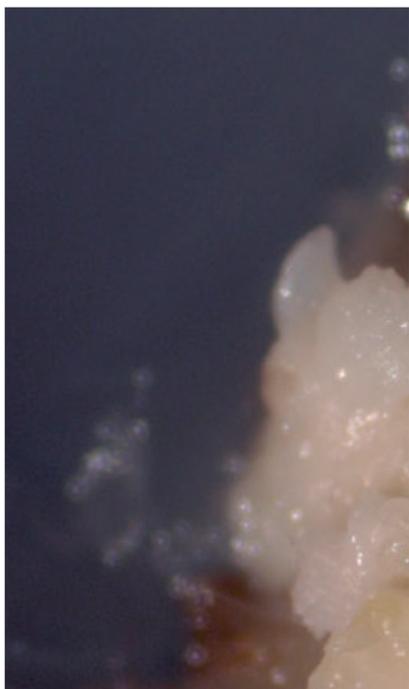


Regeneração de plantas a partir de calos  
embriogênicos das cultivares Mombaça  
e Tanzânia de *Panicum maximum*



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

**BOLETIM DE PESQUISA  
E DESENVOLVIMENTO  
356**

**Regeneração de plantas a partir de calos  
embriogênicos das cultivares Mombaça  
e Tanzânia de *Panicum maximum***

*Diva Maria de Alencar Dusi  
Paulo Sergio Pereira de Amorim  
Gláucia Barbosa Cabral  
Ana Cristina Meneses Mendes Gomes  
Liana Jank  
Vera Tavares de Campos Carneiro*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

Parque Estação Biológica  
PqEB, Av. W5 Norte (final)  
70970-717 , Brasília, DF  
Fone: +55 (61) 3448-4700  
Fax: +55 (61) 3340-3624  
www.embrapa.br  
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações  
da Unidade Responsável

Presidente  
*Milene Castellen Sathler*

Secretária-Executiva  
*Ana Flávia do N. Dias Côrtes*

Membros  
*Antonieta Nassif Salomão; Bianca Damiani Marques; Diva Maria de Alencar Dusi; Francisco Guilherme V. Schmidt; João Batista Tavares da Silva; João Batista Teixeira; Rosameres Rocha Galvão; Tânia da Silveira Agostini Costa*

Supervisão editorial  
*Ana Flávia do N. Dias Côrtes*

Revisão de texto  
*Diva Maria de Alencar Dusi*

Normalização bibliográfica  
*Ana Flávia do N. Dias Côrtes*

Tratamento das ilustrações  
*Adilson Werneck*

Projeto gráfico da coleção  
*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Editoração eletrônica  
*Adilson Werneck*

Foto da capa  
*Paulo Sérgio Pereira de Amorim*

**1ª edição**  
1ª impressão (ano): tiragem

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

---

Regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos das cultivares Mombaça e Tanzânia de *Panicum maximum* / Diva Maria Alencar Dusi et al. ... – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2019.

21 p. - (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia / Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 356).

ISSN: 0102-0110  
Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader  
Modo de Acesso: World Wide Web

1. Cultura de tecidos. 2. Biotecnologia. 3. Embrião somático. 4. Poaceae. I. Dusi, Diva Maria de Alencar. II. Amorim, Paulo Sérgio Pereira de. III. Cabral, Gláucia Barbosa. IV. Gomes, Ana Cristina Meneses Mendes. V. Jank, Liana. VI. Carneiro, Vera Tavares de Campos. VII. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. X. Série

## Sumário

---

Resumo .....	5
Abstract .....	6
Introdução.....	7
Material e Métodos .....	9
Resultados e Discussão .....	11
Agradecimentos.....	19
Referência Bibliográfica.....	19



# Regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos das cultivares Mombaça e Tanzânia de *Panicum maximum*

Diva Maria de Alencar Dusi<sup>1</sup>  
Paulo Sérgio Pereira de Amorim<sup>2</sup>  
Gláucia Barbosa Cabral<sup>3</sup>  
Ana Cristina Meneses Mendes Gomes<sup>4</sup>  
Liana Jank<sup>5</sup>  
Vera Tavares de Campos Carneiro<sup>6</sup>

**Resumo** – *Panicum maximum* é uma gramínea forrageira de alta qualidade, responsável pela intensificação da produção animal no Brasil. A Embrapa mantém coleção de acessos que serve como base para o programa de melhoramento de *Panicum* no País. Em 1990, a Empresa lançou a cultivar Tanzânia-1 e, em 1993, a cultivar Mombaça, ambas de reprodução apomítica. Com o intuito de fornecer e aprimorar ferramentas biotecnológicas a serem utilizadas nos programas de seleção e melhoramento genético, é imprescindível o desenvolvimento de métodos de cultura de tecidos de alta eficiência. Um protocolo de indução de embriogênese somática e a regeneração de plantas das cultivares Tanzânia e Mombaça de *P. maximum* está disponível. O objetivo do presente trabalho foi validar e aperfeiçoar a metodologia de regeneração de plantas via embriogênese somática de *P. maximum* cv. Tanzânia e cv. Mombaça. Um fator limitante no estabelecimento de métodos de cultura in vitro de membros da família Poaceae, é a presença de microrganismos endofíticos nas cariopses, que, in vitro, contaminam a cultura. Neste trabalho, apresentamos metodologia de desinfecção de cariopses que elimina contaminações sem comprometer a indução de embriogênese

---

<sup>1</sup> Engenheira Agrônoma, doutora em "Plant Science", pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Biólogo, mestrando, ex-bolsista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Engenheira Agrônoma, doutora em Ciências, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Bióloga, Mestre em Ciências Agrárias, analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>5</sup> Engenheira Agrônoma, doutora em Melhoramento de Plantas, pesquisadora da Embrapa Gado de Corte.

<sup>6</sup> Bióloga, doutora em "Biologie Cellulaire Et Moléculaire Végétales" pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

somática e um sistema de multiplicação dos calos embriogênicos, que resulta na regeneração de maior número de plântulas.

**Termos para indexação:** cultura de tecidos, biotecnologia, embrião somáico e poaceae.

### **Plant regeneration from embryogenic calluses of *Panicum maximum* cultivars Mombaça and Tanzânia**

**Abstract** – *Panicum maximum* is a high quality forage grass responsible for the animal production intensification in Brazil. Embrapa keeps a collection of accessions that is the basis for the *Panicum* Breeding Program in the country. In 1990, Embrapa launched the cultivar Tanzânia-1 and, in 1993, the cultivar Mombaça, both of apomictic reproduction. To provide and improve biotechnological tools, to be used in the selection and breeding programs, the development of tissue culture methods of high efficiency is indispensable. A protocol is reported for somatic embryogenesis induction and plant regeneration of *P. maximum* cultivars Tanzânia and Mombaça. This work aims to validate and improve the methodology of somatic embryos plant regeneration of *P. maximum*. A limiting aspect in the establishment of tissue culture methods of members of the Poaceae family is the presence of endophytic microorganisms in the caryopses, which, in vitro, contaminate the culture. In this work, a methodology of caryopses disinfection, that eliminates contamination without affecting the induction of somatic embryogenesis, and an embryogenic calluses propagation system that results in a higher number of regenerated plantlets is shown.

**Index terms:** tissue culture, biotechnology, somatic embryo, Poaceae

## Introdução

---

Entre as forrageiras, *Panicum maximum* é a gramínea mais produtiva propagada por sementes no Brasil (Jank et al., 2008). É uma gramínea de alta qualidade, responsável pela intensificação da produção animal no país e grande parte da terminação animal a pasto. A cultivar Colômbio, de ampla adaptação no Brasil, entrou no país com os navios negreiros servindo

de cama para os escravos, tendo se espalhado nos locais onde os navios foram descarregados (Jank, 1995). Em 1982, a Embrapa recebeu uma coleção de acessos coletados no centro de Origem na África do Leste pela instituição pública de pesquisa francesa IRD – Institut de Recherche pour le Développement. Esta coleção foi utilizada como base para o programa de melhoramento de *Panicum* no País. Foram recebidos 426 acessos apomíticos e 417 sexuais, que permitem os cruzamentos com os acessos apomíticos. Estes últimos foram avaliados quanto às características morfológicas e agrônômicas. Aqueles genótipos considerados superiores foram avaliados em rede nacional, sendo o melhor deles ou os dois melhores avaliados sob pastejo. Como resultado desse trabalho, a Embrapa lançou as cultivares Tanzânia-1 em 1990 e a Mombaça em 1993 (Jank, 1995; Jank et al., 2008). Estas cultivares apresentam reprodução por apomixia.

O termo apomixia tem origem grega e significa “sem mistura”. Referindo-se ao modo de reprodução, ele é usado como sinônimo de agamospermia, ou seja, produção de sementes de forma assexual (Nogler, 1984). Este modo de reprodução foi descrito em mais de 300 espécies de angiospermas de 36 diferentes famílias, dentre estas, espécies da família Poaceae (Hanna; Bashaw, 1987). Na reprodução por apomixia, diferentemente da reprodução sexual, a meiose e a fusão de gametas não ocorrem. Em consequência, as plantas geradas nas progênies de plantas apomíticas são idênticas à planta-mãe, sendo a apomixia, portanto, considerada um método natural de clonagem de plantas por sementes (Asker; Jerling, 1992).

A apomixia desperta grande interesse por seu potencial de fixação de genótipos superiores via semente, pela produção em massa de genótipos economicamente importantes, pela facilidade em produzir híbridos sem emasculação ou isolamento, e até mesmo pela eliminação de doenças causadas por vírus de espécies tradicionalmente propagadas por estaquia, tubérculos ou bulbos. A utilização de plantas de reprodução apomítica em pastagens gera, no entanto, preocupações quanto à baixa variabilidade genética devida à uniformidade das plantas apomíticas em uma mesma cultivar. Apesar de toda a variabilidade genética de *P. maximum* disponível, e a possibilidade da geração de nova variabilidade por meio de cruzamentos, a introdução de ferramentas biotecnológicas torna-se necessária para o processo de seleção e introdução de genes de interesse, como, por exemplo, genes de tolerância a estresses bióticos e abióticos não encontrados na

espécie. Neste contexto, é imprescindível o desenvolvimento de métodos de cultura de tecidos de alta eficiência de forma a aprimorar ferramentas a serem utilizadas nos programas de seleção e melhoramento genético como sistemas de micropropagação, manutenção de germoplasma, produção de plantas duplo-haplóides, resgate de embriões imaturos oriundos de cruzamentos incompatíveis, transformação genética.

A regeneração *in vitro* de plantas de *P. maximum* foi descrita a partir de culturas de calos derivados de embriões imaturos e inflorescências jovens, em meio de cultura contendo ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) em concentrações variáveis (Lu; Vasil, 1985). Posteriormente, foi demonstrado que os embriões somáticos e calos embriogênicos diferenciavam-se de células epidérmicas e subepidérmicas do escutelo dos embriões imaturos de *P. maximum* cultivados em meio de cultura com 2,4-D a 5 mg/L (Lu; Vasil, 1985). Nas cultivares Tanzânia e Mombaça de *P. maximum*, em experimentos de regeneração *in vitro*, foram estabelecidas a indução de embriogênese somática e a regeneração de plantas (Dusi et al., 2013).

Um importante fator limitante no estabelecimento de métodos de cultura *in vitro* de membros da família Poaceae é a presença de microrganismos endofíticos nas cariopses, favorecendo a contaminação *in vitro* (Cabral et al., 2015). Assim, o objetivo do presente trabalho foi validar e aperfeiçoar a metodologia de regeneração de plantas via embriogênese somática de *P. maximum* cv. Tanzânia e cv. Mombaça.

Neste trabalho, apresentamos uma metodologia de desinfecção de cariopses que elimina contaminações sem comprometer a indução de embriogênese somática. Para resolver a baixa eficiência de regeneração obtida em experimentos prévios (Dusi et al., 2013), foi estabelecido um sistema de multiplicação dos calos embriogênicos, resultando na regeneração de maior número de plântulas.

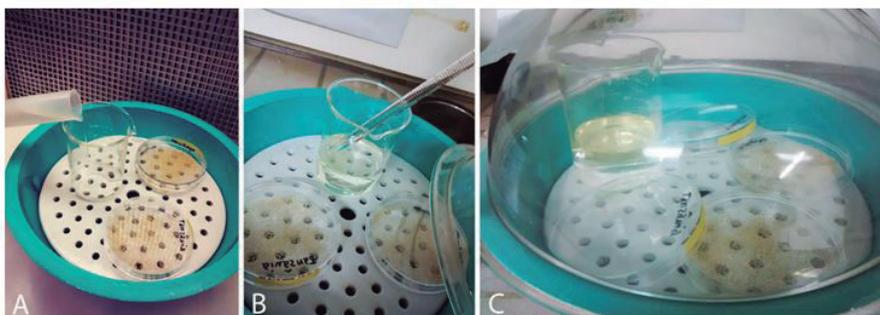
## Material e Métodos

### Material Vegetal

Foram utilizadas cariopses maduras de *Panicum maximum* (cv. Mombaça e cv. Tanzânia), armazenadas a 4 °C, fornecidas pela Embrapa Gado de Corte.

### Desinfecção das cariopses

A desinfecção foi realizada em capela de exaustão, utilizando gás cloro (Smith, 2000). A lema e a pálea das cariopses das duas cultivares foram retiradas manualmente. As cariopses foram selecionadas para eliminação das danificadas ou com impurezas e foram dispostas separadamente em placas de Petri estéreis e colocadas em dessecador de vidro. Dentro do dessecador, foi posicionado um béquer de 200 mL ao qual foram adicionados 100 mL de hipoclorito de sódio (NaClO 6% v/v) e, gota a gota, 3,5 mL de ácido clorídrico (HCl P.A. 37%). As placas de Petri contendo as cariopses foram abertas e o dessecador fechado (Figura 1A-C). As cariopses foram mantidas por 16 horas ou 24 horas no dessecador, na presença do gás cloro, resultante da dissociação iônica dos compostos da solução.



**Figura 1.** Desinfecção de cariopses de *Panicum maximum* com gás cloro na capela de exaustão. A) Adição de hipoclorito de sódio dentro de um Béquer, colocado em dessecador onde estão dispostas as placas de Petri contendo as cariopses das cultivares Tanzânia e Mombaça; B) Adição gota a gota de ácido clorídrico; C) Abertura das placas de Petri e colocação da tampa do dessecador para exposição da superfície das sementes ao gás cloro.

### **Indução de embriogênese somática**

Após a desinfecção, as cariopses foram inoculadas em meio de cultura M1.3 (Cabral et al., 2011), sendo 15 cariopses por placa de Petri. O meio de indução de calogênese, M1.3, consiste de meio basal MS (Murashige; Skoog, 1962), suplementado com 300 mg/L de hidrolisado de caseína, 3 mg/L de 2,4-D e 0,2 mg/L de BAP, pH 4,0; ágar a 1,4% (p/v). As placas foram identificadas e incubadas no escuro em sala de cultura in vitro, a 25±2 °C. Calos primários friáveis e embriogênicos obtidos foram subcultivados em meio de cultura M1.3 a cada 30 dias, por um período máximo de 120 dias.

### **Regeneração a partir de embriões somáticos**

Calos embriogênicos e friáveis, obtidos após 90 a 120 dias, foram transferidos para o meio de regeneração MS3 (Cabral et al., 2011), que consiste em meio basal MS (Murashige; Skoog, 1962) suplementado com: 2,5 mg/L de cinetina; 1 mg/L de 6-benzilaminopurina; 0,5 mg/L de ácido naftalenoacético; 300 mg de hidrolisado de caseína; sacarose 3,0% (p/v); ágar 1,4% (p/v) e pH 4,2.

### **Enraizamento das plantas**

Plantas regeneradas foram transferidas para o meio de enraizamento e manutenção de plantas, PMM (Cabral et al., 2011): Meio basal MS, suplementado com 0,2 mg/L de ácido naftalenoacético; 0,5 mg/L de cinetina; 0,2 mg/L de ácido giberélico (GA3); 100 mg/L de hidrolisado de caseína; sacarose 3,0%; ágar 0,7% (p/v) e pH 5,8.

### **Aclimação e transferência para casa de vegetação**

Após 30 dias em meio de enraizamento e manutenção, as plantas foram transferidas para potes plásticos de 200 mL, contendo vermiculita, e colocadas em casa de vegetação para aclimação. Após sete dias, as plantas foram colocadas em vasos contendo terra estéril adubada.

### **Histologia**

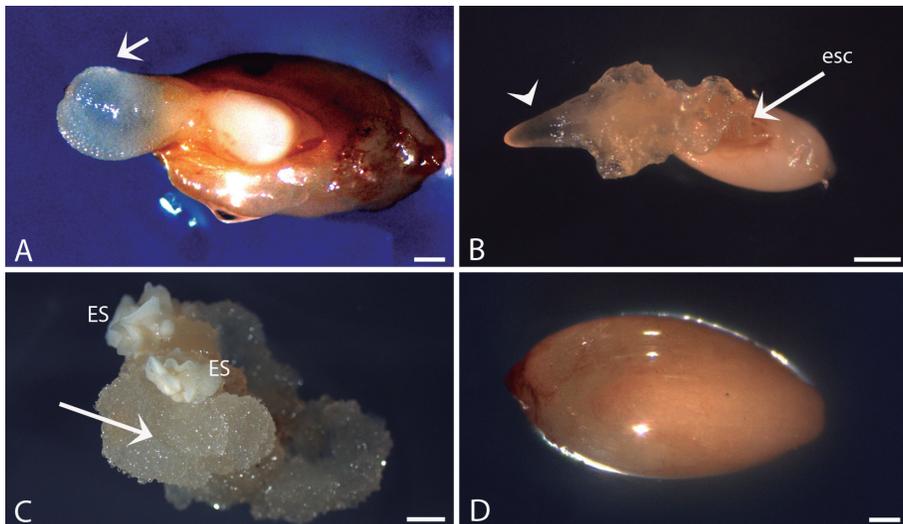
Calos embriogênicos de *P. maximum* cv. Mombaça em regeneração foram fixados em FAA (formalina, ácido acético e etanol a 70%, na proporção de 5:5:90) por 24 horas. Os calos fixados foram desidratados em série

crescente de etanol (70%, 80%, 90% v/v), e três vezes em etanol puro. Os calos foram transferidos em série crescente de etanol:xilol (3:1; 1:1; 1:3) e, então, três vezes em xilol. Em seguida, foi feita a infiltração lenta em Paraplast® a 58 °C. Secções de 7 µm foram obtidas a partir de blocos de Paraplast®, contendo os calos, e depositadas em gotas de água, dispostas em lâminas para microscopia, recobertas com Tespa e aquecidas a 42 °C, por 18 horas. Seguiu-se a coloração com safranina por 15 segundos e fast green por 25 segundos e montagem das lâminas com Permount. As lâminas foram observadas em microscópio estereoscópico, Discovery V8 em campo claro e fotodocumentadas utilizando microscópio Axiophot (Zeiss, Alemanha).

## Resultados e Discussão

---

A desinfecção de cariopses de *P. maximum* vinha sendo feita utilizando rápida imersão das cariopses descascadas em etanol 70% (v/v), seguida de imersão em hipoclorito de sódio 2% (v/v) (Dusi et al., 2013). Entretanto, com a mudança de lotes de sementes, este protocolo não estava sendo eficiente para o controle do crescimento de microrganismos endofíticos, tendo sido necessário adotar outro método de desinfecção. Assim, testou-se a exposição das cariopses ao gás cloro em dois tempos, 16 horas e 24 horas. Os dois períodos resultaram na inibição do crescimento de microrganismos endofíticos em cariopses em meio de cultura. Após três dias de cultivo em meio para indução de calos (M1.3), as cariopses, expostas por 16 horas ao gás cloro, apresentaram, como ilustrado com imagens da cultivar Tanzânia, início de turgidez na região do coleóptilo (Figura 2A) e, aos dez dias, presença de calos friáveis na base do escutelo (Figura 2B). Após trinta dias de cultura, foram observados embriões somáticos bem diferenciados, como podem ser observados na Figura 3C. Por outro lado, no tratamento de 24 horas de desinfecção com gás cloro, não foram observados calos, mesmo em cariopses cultivadas por 15 dias em meio de indução, indicando que este período foi longo demais e desfavorável à viabilidade da cultura (Figura 2D).



**Figura 2.** Etapas da cultura de cariópses de *Panicum maximum* cv. Tanzânia. (A-B) cariópse desinfestada por 16 horas em gás cloro e cultivada em meio M1.3, por três dias (A) e dez dias (B), apresentando-se livre de contaminantes. Note em (A), o crescimento do calo e turgidez da região do coleóptilo e, em (B), formação de calo do coleóptilo visível (cabeça de seta) até o escutelo (esc); (C) calo friável, desenvolvido em 30 dias de cultivo na cariópse desinfestada por 16 horas em gás cloro em M1.3, formando embriões somáticos diferenciados (ES) a partir da região embriogênica; até este momento sem o desenvolvimento de contaminantes; (D) cariópse desinfestada em gás cloro por 24 horas e cultivada em meio M1.3 sem formação de calos. Barras= A= 200  $\mu$ m; B= 500  $\mu$ m; C= 500  $\mu$ m; D= 200  $\mu$ m.

Portanto, a exposição ao gás cloro por 16 horas mostrou-se eficiente na inibição do crescimento de microrganismos endofíticos sem restringir a capacidade dos tecidos na formação de calos. Assim, utilizando este processo de desinfecção, na primeira semana de cultivo em meio M1.3, foi verificada a multiplicação de calos primários que com trinta dias sofreram diferenciação celular, quando, então, foram observados calos embriogênicos e embriões somáticos. Estes calos ao serem repicados a cada 30 dias, resultaram na multiplicação da cultura.

Após 20 dias da inoculação de cariópses em meio M1.3, dos 1.266 explantes de *P. maximum* cv. Mombaça, 26,23% formaram calos enquanto

de 1.493 explantes da cultivar Tanzânia 36,17% formaram calos. Estes resultados são compatíveis com os resultados anteriores, obtidos (Dusi et al. 2013), sendo a competência da cv. Tanzânia na resposta à indução da calogênese um pouco maior do que a da cv. Mombaça.

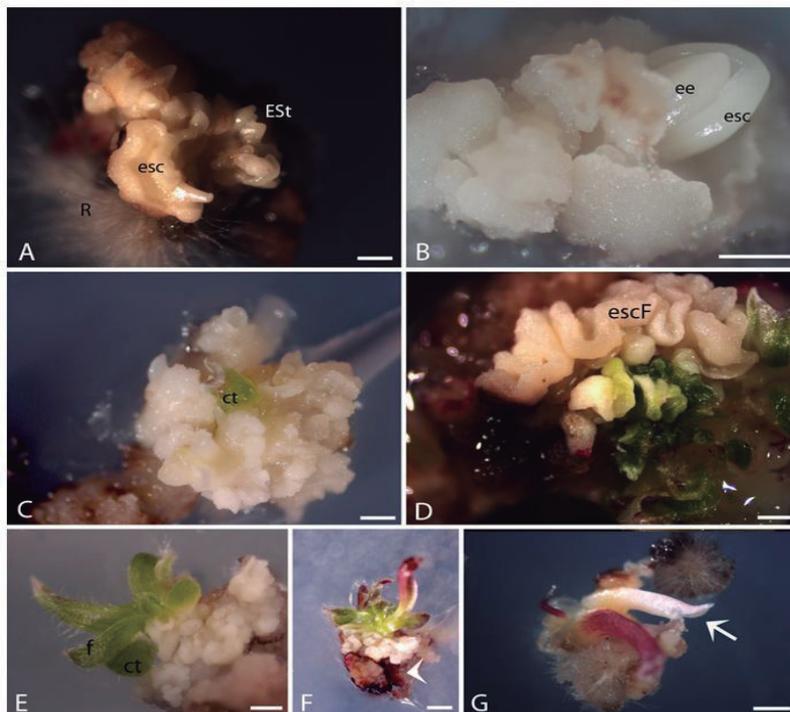
Os calos embriogênicos da cv. Mombaça, obtidos após 90 dias e transferidos para meio de regeneração, MS3, apresentaram plantas oriundas da germinação dos embriões somáticos na primeira semana, enquanto os da cv. Tanzânia, na segunda semana de cultivo.

Na Tabela 1, pode ser observado que, quanto à regeneração a partir de calos embriogênicos, os resultados mostram uma semelhança na resposta das duas cultivares. E que nos experimentos com a cultivar Mombaça foram obtidas brotações, em sua maioria verdes, no entanto, plantas albinas também foram observadas, mas em baixa porcentagem. Em ambas as cultivares, embriões que não desenvolveram brotações, tendo permanecido paralisados também foram observados com elevada frequência, em torno de 70% (Tabela 1). É possível que no caso de *Panicum maximum* seja necessária uma etapa de cultivo sem regulador de crescimento, após a indução de embriogênese somática, para elevar a taxa de regeneração, ou de conversão dos embriões somáticos em planta.

Tabela 1. Características das brotações regeneradas de *Panicum maximum* cultivares Mombaça e Tanzânia a partir da cultura in vitro de embriões somáticos (ES).

Cultivar	Nº de ES	Características das brotações (%)		
		Verdes	Albinos	Sem brotação
Mombaça #1	349	33,8	1,7	64,5
Mombaça #2	329	40,8	3,0	55,9
Mombaça #3	134	13,4	0	86,6
Média (desvio padrão)	---	29,3 (10,6)	1,6 (0,8)	69,0 (11,7)
Total	812			
Tanzânia #1	78	32,1	0	67,9
Tanzânia #2	67	13,4	0	86,6
Média (desvio padrão)	---	22,8 (9,3)	0	77,3 (9,3)
Total	145			

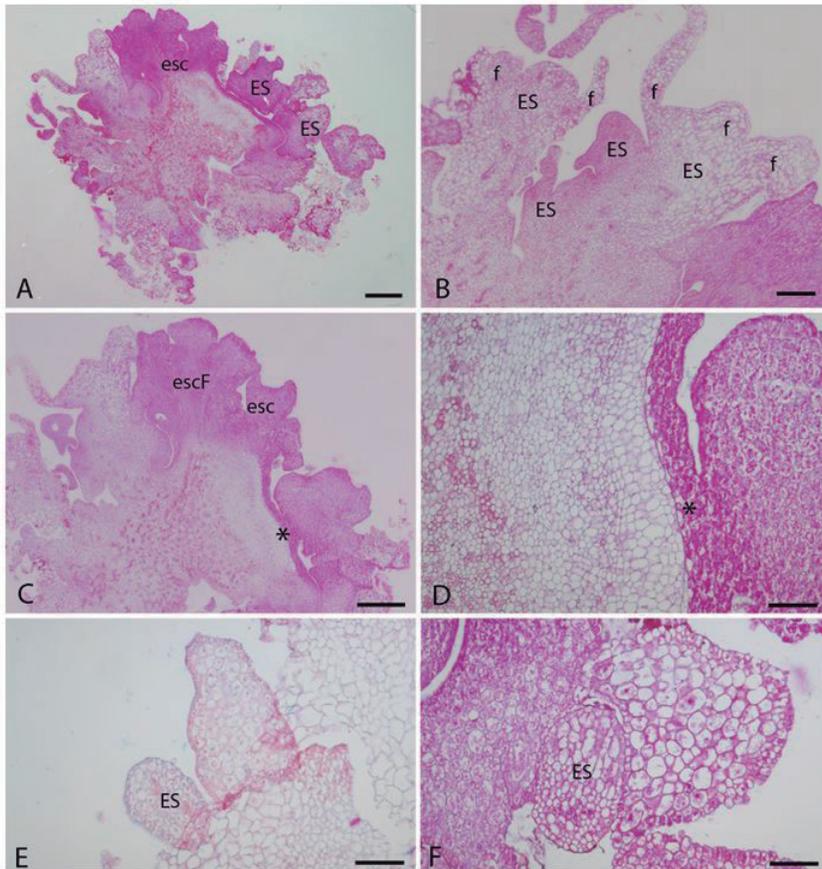
No desenvolvimento de calos embriogênicos e regeneração de plantas, como representado por imagens da cultivar Mombaça (Figura 3), foram observados vários estádios de desenvolvimento após 20 dias de cultura. Embriões globulares, que passam para a fase de torpedo, foram observados junto a escutelos bem diferenciados (Figura 3A). Em alguns calos, foram observadas raízes absorventes bem finas, resultado da germinação dos embriões somáticos. Junto aos calos embriogênicos, são observados embriões bem definidos com a formação de escutelo individualizado e eixo embrionário definido (Figura 3B), e germinação de embriões como pode ser visto pela formação de cotilédone (Figura 3C). Escutelos fusionados também foram observados ao lado de embriões germinados (Figura 3D) e plantas bem formadas com cotilédones e folhas definitivas (Figura 3E). Em alguns casos, observou-se o aparecimento de coloração vermelha em calos e folhas, indicando haver presença de antocianina (Figura 3F). Poucos embriões albinos foram observados (Figura 3G).



**Figura 3.** Etapas da embriogênese somática de *Panicum maximum* cv. Mombaça. (A) embriões somáticos com escutelo (esc) e eixo embrionário

bem definidos, embriões somáticos no estágio de torpedo (ESt) e outros em germinação, formando raízes (R) na parte próxima ao meio de cultura; (B) detalhe da diferenciação do eixo embrionário (ee) do embrião somático e escutelo individualizado (esc); (C) proliferação de embriões e início de germinação, com o desenvolvimento de cotilédone (ct); (D) diferenciação de escutelos fusionados (escF) e germinação; (E) Plântula com cotilédone e folhas definitivas (f); (F) Plântula em alongamento, apresentando antocianina nas pontas das folhas e no calo (cabeça de seta); (G) Embrião albino alongando para germinar (seta). Barras= A= 500 µm; B= 500 µm; C=500 µm; D= 500 µm; E= 500 µm; F= 1.000 µm; G=1.000 µm.

Secções histológicas de calos embriogênicos em regeneração, observados em microscópio estereoscópico, apresentaram diversidade de estádios de desenvolvimento (Figura 4A). A germinação de embriões somáticos mostra o desenvolvimento de folhas (Figura 4B). Escutelos fusionados e individualizados são observados se desenvolvendo a partir de embrião primário (Figura 4C), e o desenvolvimento de vários embriões somáticos secundários foram observados a partir de escutelo (Figura 4C-D). A região do escutelo, tanto do embrião da semente como do embrião somático de monocotiledôneas, é meristemática com elevada taxa de divisão celular, contendo células pequenas e com muito conteúdo citoplasmático que colorem fortemente, características que definem células meristemáticas que são competentes para embriogênese somática. Essas células podem ser visualizadas na Figura 4D, marcadas com asterisco. Junto com os embriões em germinação, estão presentes embriões globulares (Figura 4 E-F). A assincronia no desenvolvimento de embriões somáticos a partir de calos embriogênicos é uma característica da cultura de *P. maximum* cv. Mombaça e cv. Tanzânia nas condições aqui descritas. A embriogênese secundária aqui observada é comum em sistemas de embriogênese somática, não só em monocotiledôneas, como também em dicotiledôneas (Méndez-Hernández et al., 2019).



**Figura 4.** Secções histológicas de embriões somáticos de *Panicum maximum* cv. Mombaça. A) Embriogênese secundária, mostrando escutelos (esc) de vários embriões somáticos (ES); B) Detalhe de embriões somáticos em início de germinação, com desenvolvimento de folhas (f); C) Detalhe de embriões somáticos adjacentes mostrando escutelos fusionados (escF), escutelo simples (esc) e formação de embriões secundários a partir de região meristemática do escutelo (\*); D) Detalhe da região de formação do embrião secundário (\*); E-F) Embrião somático na fase globular. Barras: A= 0,5 mm; B= 0,2 mm; C= 0,4 mm; D-F=100  $\mu$ m.

Plantas obtidas em meio MS3 (Figura 5A), transferidas para meio PMM suplementado com GA3, apresentaram sistema radicular e parte aérea bem desenvolvida (Figura 5B). As plantas enraizadas, transferidas para casa de vegetação, responderam bem à aclimatação em vermiculita (Figura 5C), cresceram, se apresentaram saudáveis e sem alterações fenotípicas (Figura 5 D-F).



**Figura 5.** Etapas do enraizamento e transferência para casa de vegetação de *Panicum maximum* cv. Mombaça: (A) Planta crescida em meio de regeneração. (B) Planta em meio para enraizamento; (C) Planta em vermiculita, aclimatada em casa de vegetação; (D) Planta recém transferida para solo; (E-F) Plantas crescendo em casa de vegetação.

As etapas da indução e regeneração de *P. maximum* cultivares Tanzânia e Mombaça estão representadas em esquema abaixo, onde a coluna da direita indica os meios de desinfecção e cultura. Da desinfecção até o final do enraizamento, são despendidos 150 dias em cultura in vitro em sala de cultura.

Desinfecção das cariopses		NaClO 6% + HCl 9,5%	
dias	30	M1.3	
	60	M1.3	
	90	M1.3	
	120	Regeneração	MS3
	150	Enraizamento	PMM
	157	Aclimação	Vermiculita

**Figura 6.** Representação esquemática das etapas cronológicas da cultura in vitro da embriogênese, a partir de cariopses de *Panicum maximum*.

Neste trabalho, a exposição das cariopses ao gás cloro mostrou-se eficiente para a desinfecção, sem comprometer sua viabilidade. Diferentes combinações de meios de cultura levaram à diferenciação de calos e regeneração de embriões somáticos. A indução da embriogênese somática foi obtida em meio de indução (M1.3), com a multiplicação de calos primários já na primeira semana. A repicagem dos calos a cada 30 dias proporcionou a multiplicação da cultura. A diferenciação celular e a obtenção de embriões somáticos foram observadas após o trigésimo dia de indução.

A resposta à cultura de tecidos depende de vários fatores como composição do meio de cultivo, tempo de cultura, luminosidade, umidade, natureza e condições fisiológicas do explante inicial. O genótipo da planta também pode ser determinante sendo que algumas espécies são consideradas recalcitrantes à cultura de tecidos, incluindo gramíneas. O sistema de embriogênese somática de *P. maximum* cultivares Mombaça e Tanzânia, apresentado neste trabalho, é adequado à utilização como ferramenta do programa de melhoramento de *P. maximum*, como a micropropagação, pela multiplicação de embriões, que pode ser aplicada em processos de conservação, na criopreservação, e implementada em grande escala de modo automatizado, além de ser adequada à utilização em métodos de transformação genética de plantas.

## Agradecimentos

---

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) pelo apoio financeiro e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa PIBIC de Paulo Sérgio Pereira de Amorim.

## Referência Bibliográfica

---

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

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

CABRAL, G. B.; CARNEIRO, V. T. C.; ROSSI, M.; SILVA, J.; MARTINELLI, A.; DUSI, D. M. A. Plant regeneration from embryogenic callus and cell suspensions of *Brachiaria brizantha*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.51, 2015.

DUSI, D. M. A.; CABRAL, G. B.; OLIVEIRA, R. B.; JANK, L.; CARNEIRO, V. T. C. Avaliação do potencial embriogenético de sementes maduras das cultivares Tanzânia e Mombaça de *Panicum maximum*. In: WORKSHOP SOBRE TOLERÂNCIA A ESTRESSES ABIÓTICOS EM PLANTAS FORRAGEIRAS, 2013, Campo Grande, MS. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa, 2013. 104 p. (Embrapa Gado de Corte. Documentos, 199).

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

JANK, L. Melhoramento e seleção de variedades de *Panicum maximum*. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 12., 1995, Piracicaba. **O capim colômbio: anais**. Piracicaba, FEALQ, 1995. p.21-58.

JANK, L.; RESENDE, R.; VALLE, C.; RESENDE, M.; CHIARI, L.; CANCADO, L.; SIMIONI, C. Melhoramento Genético de *Panicum maximum* Jacq. In: RESENDE, R. M. S.; VALLE, C. B. do; JANK, L. (Ed.). **Melhoramento de forrageiras tropicais**. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2008. p. 55-87.

LU, C. Y.; VASIL, I. K. Histology of somatic embryogenesis in *Panicum maximum* (Guinea grass). **American Journal of Botany**, v.72, n.12, p.1908-1913, 1985.

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

MÉNDEZ-HERNÁNDEZ, H. A.; LEDEZMA-RODRÍGUEZ, M.; AVILEZ-MONTALVO, R. N.; JUÁREZ-GÓMEZ, Y. L.; SKEETE, A.; AVILEZ-MONTALVO, J.; DE-LA-PEÑA, C.; LOYOLA-VARGAS, V. M. (2019) Signaling Overview of Plant Somatic Embryogenesis. **Frontiers in Plant Science**, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00077>.

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

SMITH, R. H. **Plant tissue culture**: techniques and experiments. 2.ed. San Diego: Academic Press, 2000. 231 p.



---

*Recursos Genéticos e  
Biotecnologia*



CGPE: 15849