

Lorem ipsum



COMUNICADO
TÉCNICO

215

Brasília, DF
Outubro, 2023

Embrapa

Metodologia de polinização in vitro de braquiária (*Urochloa* spp.)

Diva Maria de Alencar Dusi
Elizangela Ribeiro Alves
Michiel Theodoor Maria Willemsse
Rosana Falcão
Cacilda Borges do Valle
Vera Tavares de Campos Carneiro

Metodologia de polinização in vitro de braquiária (*Urochloa* spp.)¹

¹Diva Maria de Alencar Dusi, engenheira-agrônoma, doutora em Plant Sciences, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. Elizangela Ribeiro Alves, bióloga, doutora em Biologia Molecular, bolsista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. Michiel Theodoor Maria Willemse, professor aposentado de Botânica na Universidade Agrícola de Wageningen, Holanda. Rosana Falcão, Bióloga e matemática, mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia, analista da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF. Cacilda Borges do Valle, engenheira-agrônoma, doutora em Melhoramento de Plantas, pesquisadora aposentada da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS. Vera Tavares de Campos Carneiro, Bióloga, doutora em Biologia Celular e Molecular Vegetais, pesquisadora Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

A polinização é o processo de transferência do pólen de um estame para um estigma que se estende até a chegada do tubo polínico ao óvulo (van Went; Willemse, 1984; Lawrence, 1997; Fosket, 1994). O grão de pólen maduro liberado da antera entra em contato com um estigma compatível, onde sofre hidratação e germina formando o tubo polínico que cresce ao longo do estigma e dentro do estilete alcançando a micrópila e por fim, o saco embrionário. Quando o tubo polínico alcança uma das sinérgides ocorre a liberação das duas células espermáticas. Uma destas funde-se à oosfera permitindo a fusão dos dois núcleos para formar o zigoto que se desenvolverá em embrião. O núcleo da outra célula espermática une-se ao núcleo diplóide, da célula central, formando um núcleo triploide e, como consequência, o endosperma. Este processo é conhecido como dupla fecundação.

Forrageiras do gênero *Urochloa*, aqui referidas pelo nome comum de braquiária, reproduzem-se principalmente por apomixia, reprodução assexual via sementes. As plantas apomíticas de braquiária são pseudogâmicas, necessitando da fertilização apenas para a formação do endosperma (Ngendahayo, 1988; Alves et al., 2001), pois a oosfera se desenvolve autonomamente em embrião (para revisão ver Dusi 2001; Carneiro; Dusi 2002, 2004). O cruzamento intra-específico é dificultado pela apomixia e pela diferença de ploidia entre plantas sexuais e apomíticas da mesma espécie (Valle, 1990; Valle et al., 2004, 2009). Além disso, cruzamentos interespecíficos entre plantas tetraplóides sexuais e apomíticas resultam em alta mortalidade de plântulas e baixo número de híbridos obtidos (Ngendahayo et al., 1988) sugerindo incompatibilidade genética interespecífica. Híbridos intraespecíficos estão sendo obtidos com cruzamentos entre

plantas apomíticas e plantas sexuais da mesma espécie com número cromossômico duplicado artificialmente (Monteiro et al., 2016).

A polinização *in vitro* permite contornar as barreiras naturais que impedem a penetração do tubo polínico no saco embrionário, sendo o primeiro passo para a fecundação, ou fertilização *in vitro* e, com técnicas de cultura de ovários, a recuperação de híbridos que não podem ser obtidos por métodos convencionais. Neste trabalho apresentamos em detalhes a metodologia de polinização *in vitro* de *Urochloa* spp., baseada em Dusi et al. (2010). Este protocolo abre novas possibilidades para o melhoramento via fertilização *in vitro*, o estabelecimento de genótipos compatíveis e o estudo de processos de incompatibilidade, fertilização e embriogênese.

Palavras-chave: apomixia, fertilização *in vitro*, germinação do grão de pólen, viabilidade do pólen, braquiária

Meio de cultura e soluções

Solução de verde de lissamina

(verde de lissamina 1% em meio isotônico)

1 g de verde de lissamina

100 mL de meio B5 com metade da concentração de sais (Gamborg et al. 1968) e adicionado de 6,5% de sacarose.

Meio de cultura para germinação de polens, crescimento de tubos polínicos e polinização *in vitro*

Meio basal contendo ácido bórico 0,03 g/L; nitrato de cálcio 0,03 g/L acrescido de agar 0,19% ou de Phytigel® 0,15%; sacarose 33%. Aproximadamente 15 mL de meio por placa de Petri de 9 cm de diâmetro.

Solução de azul de anilina

(azul de anilina 1% em K_2HPO_4 0,15M)

1 g de azul de anilina, solúvel em água

100 mL de K_2HPO_4 0,15M

Solução fixadora - FAA

Fomaldeído 37%, ácido acético glacial, etanol 70%; 1: 1: 18 (v/v)

5 mL fomaldeído 37%

5 mL ácido acético glacial

90 mL etanol 70%

Determinação da viabilidade polínica

A viabilidade polínica pode ser determinada, dentre outros, por um dos métodos apresentados abaixo, sendo que o primeiro método é indireto e detecta

células mortas e o segundo é mais preciso, pois detecta a germinação do pólen. A escolha do método depende somente das condições do laboratório,

Por coloração dos grãos de pólen com verde de lissamina (*lissamine green*)

Verde de lissamina é um corante vital que penetra na célula quando a membrana plasmática está danificada, e colore de azul ou verde as células que estão morrendo ou mortas (Holmberg 1961). Os polens que apresentam coloração azul ou verde são considerados mortos.

- a) Coletar inflorescências de braquiária contendo racemos com espiguetas maduras, antes da antese (abertura da flor) ou em antese (Figuras 1A e 1B), e colocar em recipiente contendo água.
- b) Com auxílio de lupa, coletar anteras de flores hermafroditas (que possuem órgãos reprodutivos masculinos e femininos, Figura 1C), maduras (no máximo 20 h antes da antese).
- c) Abrir as anteras, retirar os grãos de pólen, depositá-los em lâminas de vidro para microscopia, e adicionar uma gota de *lissamine green* 1% em solução isotônica.
- d) Cobrir com a lamínula e observar utilizando microscopia de luz em campo claro.

O pólen com capacidade para germinar deve, além de vivo, ser maduro, ou seja, deve possuir três núcleos, um núcleo vegetativo e dois núcleos das células reprodutivas, deve ser túrgido e de forma arredondada (Figura 1D). A antera madura possui vários estádios de desenvolvimento do pólen (Figura 1E). Micrósporos com um ou dois núcleos e vacúolo grande não possuem capacidade germinativa e no contexto de polinização, embora vivos, são considerados inviáveis.

- e) Contar o número total de grãos de pólen em uma área definida e o número de grãos com coloração azul ou verde (Figuras 1F e 1G).
- f) Calcular a porcentagem de grãos de pólen abortados ou mortos.

Pela observação da germinação de grãos de pólen in vitro

- a) Coletar inflorescências contendo racemos com espiguetas maduras, em antese, e colocar em recipiente contendo água.
- b) Retirar as anteras das flores hermafroditas em antese (Figuras 1A e 1C).
- c) Com uma pinça, segurar as anteras recém-abertas e depositar os grãos de pólen em meio de cultura de polinização.

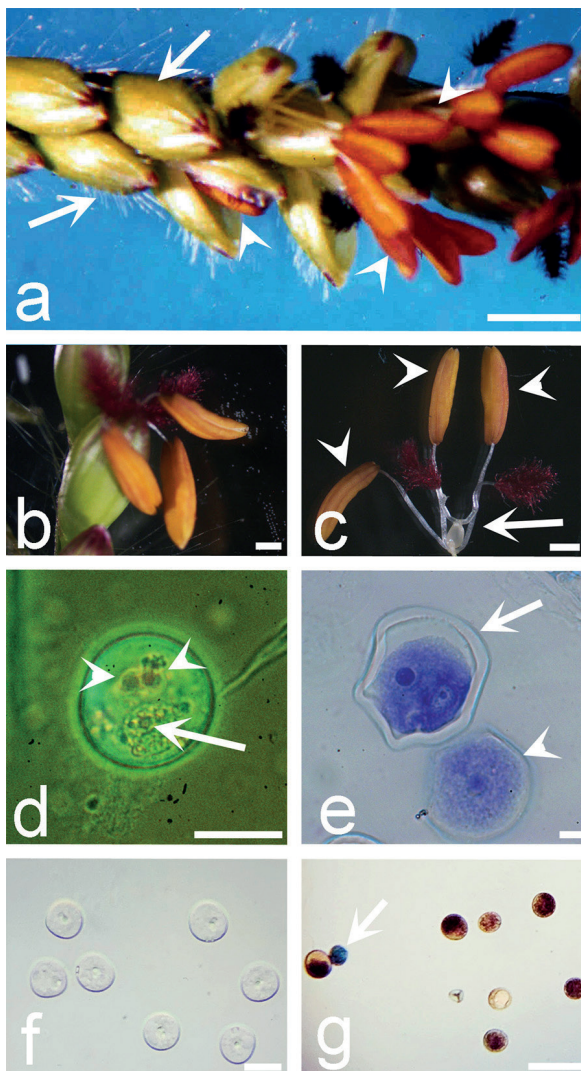


Figura 1. Inflorescência de braquiária **a** Parte de um racemo com espiguetas em antese (cabeças de seta) e logo antes da antese (setas). **b** Detalhe de uma espiguetta com flor hermafrodita em antese. **c** Flor hermafrodita dissecada para mostrar as partes feminina, pistilo (seta) e masculina, os três estames, contendo três anteras (cabeça de seta). **d** Grão de pólen observado em microscopia de luz clara e ultra violeta possui uma célula vegetativa (seta) e duas células reprodutivas (cabeça de seta). **e** Corte histológico de uma antera madura onde se observa dois estádios de desenvolvimento do pólen, um micrósporo com um núcleo (cabeça de seta) e o pólen com três células (seta). **f** Grãos de pólen antes da coloração com *lissamine green* não possuem coloração. **g** Grãos de pólen após coloração com *lissamine green*, a coloração azul esverdeada aparece nos grãos danificados ou seja mortos (seta). Barras: a = 4 mm; b, c = 1 mm, d = 20 μ m; e = 5 μ m; f = 30 μ m; g = 40 μ m.

- d) Após duas horas observar com o auxílio de uma lupa, a germinação dos grãos de pólen.
- e) Contar o número de grãos de pólen que apresentam emissão de tubos polínicos e calcular a porcentagem.

Processo de polinização in vitro

Coleta e desinfestação do material vegetal

- f) Coletar no período da tarde, inflorescências de braquiária contendo racemos com espiguetas maduras, antes da antese, e colocar em recipiente contendo água.
- g) Retirar os racemos e desinfestar por imersão em álcool 70% por 2 min.
- h) Remover o álcool e adicionar solução de hipoclorito de sódio 1,5% acrescentado de uma gota de Tween 40 por 20 min.

A desinfestação do material é opcional e pode ser omitida nos experimentos de duração de até 48 h.

- i) Lavar três vezes com água destilada e autoclavada.
- j) Manter os racemos em placa de Petri umedecida e manter em temperatura ambiente até o dia seguinte para a polinização in vitro.

A manutenção da umidade dos racemos é importante.

Polinização in vitro

- a) Em condições assépticas, com o auxílio de pinça e bisturi, remover das inflorescências, imediatamente antes da abertura ou recém-abertas, pistilos maduros, que possuem estigma bem plumoso e de coloração vermelho forte (Figura 2A), cortando pela base do pistilo (Figura 2B). O corte na base do pistilo deve ficar abaixo da região micropilar (Figura 2C). Em cada placa de Petri contendo meio de polinização depositar dez pistilos separados entre si.

Ponto crítico: é muito importante que o corte na base do ovário seja feito sem danificar a micrópila que é por onde o tubo polínico penetra no óvulo.

- b) Retirar as anteras das flores hermafroditas imediatamente antes da antese ou em antese. Depositar as anteras indeiscentes em uma placa de Petri sem meio de cultivo e colocar sob luz incandescente até o início da abertura (Figura 2D).

A deiscência ocorre das extremidades para o centro – o melhor momento para a coleta do pólen é quando as anteras estão apenas com uma das extremidades aberta.

- c) Com uma pinça, segurar as anteras recém-abertas e depositar os

grãos de pólen no meio de cultura de polinização próximo à base dos ovários anteriormente dispostos. Após quatro horas já é possível visualizar o crescimento dos tubos polínicos em direção à parte basal do ovário onde se encontra a micrópila (Figura 2E).

Ponto crítico: o momento da coleta dos grãos de pólen e sua condição são críticos.

Observação do crescimento e penetração do tubo polínico no saco embrionário utilizando azul de anilina

Azul de anilina é um corante que destaca a calose e indicará a capacidade de emissão de tubo polínico pelo grão de pólen, com a emissão de fluorescência de cor azul ou amarela o que permite a visualização de sua trajetória.

- d) Após 24 h da polinização, separar os pistilos que tiverem tubos polínicos aderidos e colocar em um microtubo.
- e) Adicionar solução fixadora de etanol: ácido acético 3: 1 (v/v), num volume equivalente a duas vezes o volume ocupado pelos pistilos e deixar por 30 m.
- f) Retirar delicadamente a solução fixadora e gotejar solução de etanol 70% até cobrir os pistilos.

- g) Após 1 h enxaguar três vezes em água destilada.
- h) Transferir para NaOH 8 N por pelo menos 3 h.
- i) Corar os pistilos com solução de azul de anilina 1% (p/v) por 4 h a 6 h.
- j) Colocar os pistilos sobre uma lâmina de microscopia escavada.
- k) Adicionar uma gota de glicerol, cobrir com lamínula e examinar.
- l) Observar o crescimento do tubo polínico com microscópio de fluorescência com filtro de comprimento de onda de excitação de 365 nm e de emissão de 397 nm (Figura 2F) e com microscópio de luz utilizando contraste de interferência diferencial (Figura 2G). Apenas um tubo polínico penetra pela micrópila (Figura 2F e 2G), e mesmo que haja apenas um pólen germinando, perto da base, ele é atraído para a micrópila (Figura 2F).

Observação da transferência das células espermáticas e fertilização

- m) Após 24 h ou 48 h da polinização, separar os pistilos que tiverem tubos polínicos aderidos à base e transferir para frasco contendo fixador FAA por 24 h à temperatura ambiente.

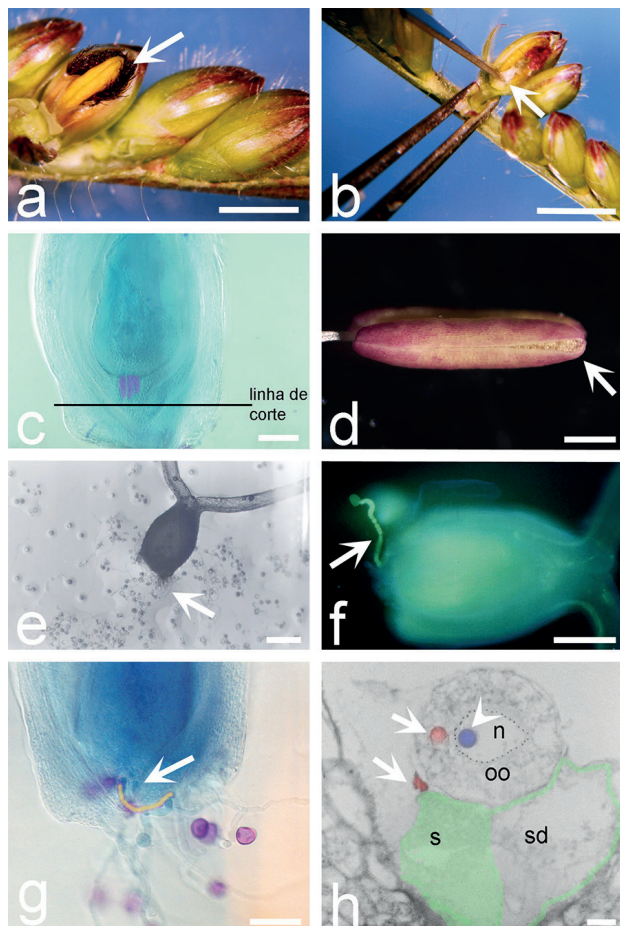


Figura 2. Polinização *in vitro* em braquiária **a** Parte de um racemo de braquiária com uma espiguetta aberta mostrando a flor hermafrodita contendo pistilo com estigma bem plumoso e de coloração vermelho forte (seta). **b** Coleta do pistilo, com auxílio de pinça e bisturi, pelo corte na região basal do ovário (seta). **c** Ovário observado em microscopia de interferência diferencial colorido artificialmente em rosa para destacar a região da micrópila, mostrando a região abaixo da micrópila em que o corte deve ser feito (linha de corte). **d** Antera com a extremidade aberta (seta), momento apropriado para a polinização. **e** Pistilo após a polinização em meio de cultura mostrando os tubos polínicos crescendo (seta) em direção à base do ovário (cabeça de seta). **f** Tubo polínico crescendo em direção à região micropilar do ovário (seta) visualizado com luz UV em microscópio de fluorescência. **g** Ovário observado utilizando contraste de interferência diferencial com tubos polínicos crescendo em direção à micrópila (seta), um dos quais penetrando o óvulo (colorido em amarelo). **h** Sobreposição de imagens de duas secções de ovário contendo a oosfera (oo) na qual se observa o núcleo (n) e o nucléolo (cabeça de seta), uma sinérgide completa (s) e uma sinérgide degenerada (sd) pela qual o tubo polínico entrou liberando as duas células espermáticas (setas); cores artificiais foram adicionadas para melhor visualização. Barras: a = 3 mm; b = 6 mm; c, f = 45 μ m; d = 0,5 mm; e = 90 μ m; g = 30 μ m; h = 3 μ m.

- n) Desidratar em série crescente de etanol (70, 80 e 95%) por 1 h cada.
- o) Transferir para etanol 95% adicionado de solução de inclusão (JB-4 *Embedding Kit*, Polyscience) 1:1 (v: v), à temperatura ambiente por 12 h.
- p) Depositar as amostras em solução de inclusão pura a 4 °C por aproximadamente 18 h.
- q) Trocar a solução de inclusão e submeter o sistema a vácuo por mais 2 h à temperatura ambiente.
- r) Posicionar as amostras em cápsula plástica a 4 °C e adicionar a solução de inclusão com solução aceleradora (kit) e colocar em estufa a 60 °C por 24 a 48 h para polimerização.
- s) Seccionar em espessura de 3 mm - 5 mm, e coletar corte por corte depositando sobre uma gota de água em lâmina de microscopia.
- t) Deixar secar por 5 min sobre chapa a 50 °C.
- u) Corar com solução aquosa de azul astra e safranina (0,9 e 0,1% (v/v) respectivamente) por 2 - 3 m.
- v) Remover o excesso do corante com etanol 70%, observando o resultado.
- w) Montar as lâminas com Permount® SP15-500 (Fisher Chemicals-Fisher Scientific).

- x) Analisar utilizando microscópio de luz (Zeiss-Axiophot) em campo claro (Figura 2H).

Após a polinização *in vitro* pode-se também fazer a cultura *in vitro* de ovários para acompanhamento dos estádios de desenvolvimento do embrião e endosperma.

Conclusão

Utilizando este protocolo é possível a introdução das células espermáticas no saco embrionário de forma controlada para posterior cultura de ovários e resgate de embriões. A formação de zigoto e embriões pode ser acompanhada com marcadores para embriogênese (Koehler et al. 2020, Silveira et al. 2022). O protocolo descrito compõe um portfólio de técnicas e metodologias desenvolvidas na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cabral et al. 2011, 2015, 2016, 2018, Koehler et al. 2021, 2023) visando à utilização da biotecnologia para melhoramento e estudo da reprodução de braquiária.

Referências

- 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, p. 207-212, 2001.
- CABRAL, G.; CARNEIRO, V.; LACERDA, A.; DO VALLE, C.; MARTINELLI, A.; DUSI, D. 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.; DUSI, D. M. A.; MARTINELLI, A. P. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Brachiaria brizantha*. In: GERMANA, M. A.; LAMBARDI, M. (Eds.). **In Vitro Embryogenesis in Higher Plants**. In vitro embryogenesis in higher plants. New York: Humana, 2016. p. 395-402. (Methods in molecular biology, 1359).
- CABRAL, G. B.; CARNEIRO, V. T. C.; GOMES, A. C. M. M.; LACERDA, A. L. M.; MARTINELLI, A. P. DUSI, D. M. A. Genetic transformation of *Brachiaria brizantha* cv. Marandu by biolistics. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 2, 2018.
- CABRAL, G. B.; CARNEIRO, V. T. C.; ROSSI, M. L.; SILVA, J.; MARTINELLI, A. P. DUSI, D. M. A. Plant regeneration from embryogenic callus and cell suspensions of *Brachiaria brizantha*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 51, n. 3, p. 369-377, 2015.
- CARNEIRO, V. T. C.; DUSI, D. M. A. Apomixia: em busca de tecnologias de clonagem de plantas por sementes. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 25, n. março/abril, p. 36-42, 2002.
- CARNEIRO, V. T. C.; DUSI, D. M. A. **Clonagem de plantas por sementes**: estratégias de estudo da apomixia. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. 92 p.
- DUSI, D. M. A. **Apomixis in *Brachiaria decumbens* Stapf**. 2001. Tese (Doutorado). Wageningen: Wageningen Universiteit, 167 p.
- Dusi, D. M. A.; Alves, E. R.; Willemse, M. T. M.; Falcão, R.; Valle, C. B. do; Carneiro, V. T. C. Toward in vitro fertilization in *Brachiaria* spp. **Sexual Plant Reproduction**, v. 23, p. 187-197, 2010.
- FOSKET, D. E. **Plant growth and development**: a molecular approach. San Diego: Academic Press, 1994. 580 p.
- Gamborg, O. L.; Miller, R. A.; Ojima, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, p. 151-158, 1968.
- Holmberg; B. On the permeability to lissamine green and other dyes in the course of cell injury and cell death. **Experimental Cell Research**, v. 22, p. 406-414, 1961.
- KOEHLER, A. D.; IRSIGLER, A. S. T.; CARNEIRO, V. T. C.; CABRAL, G. B.; RODRIGUES, J. C. M.; GOMES, A. C. M. M.; TOGAWA, R. C.; COSTA, M. M. C.; MARTINELLI, A. P. DUSI, D. M. A. SERK genes identification and expression analysis during somatic embryogenesis and sporogenesis of sexual and apomictic *Brachiaria brizantha* (Syn. *Urochloa brizantha*). **Planta**, v. 252, n. 3, p. 39, 2020.
- KOEHLER, A. D.; CABRAL, G. B.; GOMES, A. C. M. M.; CARNEIRO, V. T. C.; MARTINELLI, A. P.; DUSI, D. M. A. **Metodologia para identificação rápida de regiões embriogênicas em culturas de células em suspensão de *Brachiaria brizantha* (A.Rich.) Stapf (syn. *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A.Rich.) R. D. Webster)**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2021. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia / Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 375).
- KOEHLER, A. D.; ROSSI, M. L.; CARNEIRO, V. T. C.; CABRAL, G. B.; MARTINELLI, A. P.; DUSI, D. M. A. Anther development in *Brachiaria brizantha* (syn. *Urochloa brizantha*) and perspective for microspore in vitro culture. **Protoplasma**, v. 260, p. 571-587, 2023.
- LAWRENCE, E. **Henderson's dictionary of biological terms**. 11. ed. London: Longman, 1997. 693 p.
- Monteiro, L. C.; Verzignassi, J. R.; Barrios, S. C. L.; Valle, C. B.; Fernandes, C. D.; Benteo, G. L.; Libório, C. B. Characterization and selection of interspecific hybrids of *Brachiaria decumbens* for seed production in Campo Grande - MS. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.16, n. 3, p. 174-181, 2016.
- Ngendahayo, M. **Mécanismes de la reproduction dans le genre *Brachiaria***. 1988. Tese (Doutorado). Université Catholique de Louvain, Louvain-Belgium, 82 p.
- SILVEIRA, S. R. da; KOEHLERA, A. D.; GOMES, A. C. M. M.; CABRAL, G. B.; CARNEIRO, V. T. de C.; DUSI, D. M. de A.; MARTINELLI, A. P. Somatic embryogenesis of *Brachiaria brizantha* (Syn. *Urochloa brizantha*) analyzed by in situ hybridization. In: RAMÍREZ-MOSQUEDA, M. A. (Ed.). **Somatic Embryogenesis**. New York: Humana, 2022. p. 247-263. (Methods in Molecular Biology, v. 2527).

VALLE, C. B. do. **Coleção de germoplasma de espécies de *Brachiaria* no CIAT**: estudos básicos visando ao melhoramento genético. Campo Grande, MS: Embrapa-CNPGC, 1990. 33 p. (EMBRAPA-CNPGC. Documentos, 46).

Valle, C. B.; Bonato, A. L. V.; Pagliarini, M. S.; Resende, R. M. S.; Jank, L. Apomixia e sua utilização no melhoramento de *Brachiaria*. In: CARNEIRO, V. T. de C.; DUSI, D. M. de A. (Ed.). **Clonagem de plantas por sementes**:

estratégias de estudo da apomixia. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. p. 47-66.

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

Van Went, J. L.; Willemsse, M. T. M. Fertilization. In: JOHRI, B. M. **Embryology of angiosperms**. Berlin: Springer (Verlag), 1984. p. 274-317.

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Parque Estação Biológica (PqEB)
Av. W5 Norte (final)

CEP: 70770-917, Brasília, DF

Fones: (61) 3448-4700/(61) 3448-4739

www.embrapa.br

www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição

Publicação digital (2023): PDF



MINISTÉRIO DA
**AGRICULTURA E
PECUÁRIA**



Comitê Local de Publicações da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Presidente

Marcelo Lopes da Silva

Secretária-Executiva

Ana Flávia do Nascimento Dias

Membros

*Andrielle Câmara Amaral Lopes,
Bruno Machado Teles Walter,
Débora Pires Paula, Edson Junqueira
Leite, Marcos Aparecido Gimenes,
Solange Carvalho Barrios Roveri José*

Supervisão editorial

Ana Flávia do Nascimento Dias

Revisão de texto

Maria Cristina Ramos Jubé

Normalização bibliográfica

Rosamares Rocha Galvão

Tratamento das ilustrações

Júlio César da Silva Delfino

Projeto gráfico da coleção

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica e capa

Júlio César da Silva Delfino

Foto da capa

Diva Maria Alencar Dusi

CGPE 018350