

**Indução de embriogênes somática  
em folhas de *Brachiaria brizantha***

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

## ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 227***

### **Indução de embriogêneses somática em folhas de *Brachiaria brizantha***

G. B. Cabral  
R. W. Souza  
L. Oliveira  
V. T. C. Carneiro  
D. M. A. Dusi

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –

Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624

<http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

**Presidente:** *Miguel Borges*

**Secretária-Executiva:** *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

**Membros:** *Diva Maria de Alencar Dusi*

*Luiz Adriano Maia Cordeiro*

*José Roberto de Alencar Moreira*

*Regina Maria Dechechi G. Carneiro*

*Samuel Rezende Paiva*

**Suplentes:** *João Batista Tavares da Silva*

*Margot Alves Nunes Dode*

**Supervisor editorial:** *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

**Normalização Bibliográfica:** *Rosameres Rocha galvão*

**Editoração eletrônica:** *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

**Figura da Capa:** A e B – Calos (apomítico) com 15 dias de indução em pH 5,8 e 4; (A) com estruturas globulares semelhantes a pró-embriões (seta preta) barra ~1mm; (B) apresentando estruturas globulares e primórdios radiculares (seta branca) barra ~1mm. C, D e E – Calos (sexual) formados em 15 dias de indução em pH 4.0 (C) e pH 5,8 (D,E) apresentando formação de raízes (setas) barra ~1mm.

1ª edição

1ª impressão (2008):

**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**

---

A 42 Indução de embriogêneses somática em folhas de *Brachiaria brizantha*. / G. B. Cabral ... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.

20 p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340; 227).

1. *Brachiaria brizantha*. 2. Embriogenese. 3. Planta - Forrageira. I. Cabral, G. B. II. Série.

633.2 – CDD 21

# Sumário

<b>Resumo .....</b>	<b>5</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>6</b>
<b>Material e Métodos.....</b>	<b>6</b>
<b>Resultados e Discussão .....</b>	<b>7</b>
<b>Conclusão .....</b>	<b>9</b>
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>9</b>

# Indução de embriogêneses somática em folhas de *Brachiaria brizantha*

G. B. Cabral<sup>1</sup>

R. W. Souza<sup>2</sup>

L. Oliveira<sup>3</sup>

V. T. C. Carneiro<sup>4</sup>

D. M. A. Dusi<sup>4</sup>

## Resumo

*Brachiaria brizantha* é uma das mais importantes espécies forrageiras para a produção de gado de corte no Brasil. Esta espécie apresenta um dos genótipos mais plantados que é o apomítico tetraplóide, a cultivar Marandu, e um acesso sexual que é diplóide. O programa de melhoramento desta forrageira na EMBRAPA vai contar em breve com a ferramenta de transformação genética, que vem sendo desenvolvida no laboratório de reprodução vegetal do Cenargen. O sistema de embriogênese somática usado para a cultivar apomítica, vem sendo desenvolvido a partir de sementes maduras, no entanto, o acesso sexual é muito ineficiente na produção de sementes, sendo necessário um método alternativo de regeneração de plantas in vitro. Este trabalho teve como objetivo testar a capacidade morfogenética de folhas de plântulas cultivadas in vitro para a embriogênese somática nos acessos sexual e apomítico. Para tal, plântulas cultivadas in vitro foram repicadas em meio B até atingirem 6 cm de altura, quando tiveram sua folha bandeira excisada e cortada transversalmente em pedaços de 1 mm, que foram inoculados em meio ML1G1 pH 4 ou 5,8. Os explantes foram cultivados no escuro a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  por períodos de 15, 20 ou 30 dias. Após esses períodos, os fragmentos foliares foram transferidos para o meio ML1C2 pH 4 ou 5,8 por períodos de cultura na ausência de luz de 15, 10 e 30 dias, respectivamente. Depois desses dois períodos de indução, os explantes foliares foram transferidos para os meios ML1R3 e ML1R4 por 30 dias em cada um deles na presença de luz em câmara de crescimento a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  para a regeneração. Os calos obtidos nos explantes foliares apresentaram-se hídricos e outras vezes friáveis, com estruturas globulares semelhantes a embriões somáticos, dependendo do pH do meio. Quando os calos foram transferidos para meio de regeneração, alguns deles apresentaram pigmentos de antocianina, característico de início de formação de brotos no processo de germinação de embriões somáticos desta espécie, encontrando-se ainda neste meio de regeneração por mais duas semanas.

---

<sup>1</sup> Agrônoma, MSc. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>2</sup> Estudante do 3º ano ensino médio, CEFPMs, Planaltina, DF.

<sup>3</sup> Biólogo, graduado pela FTB, Recanto das Emas, DF.

<sup>4</sup> Bióloga, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

## Introdução

*Brachiaria brizantha* é uma das mais importantes espécies forrageiras para a produção de gado de corte no Brasil. Esta espécie apresenta um dos genótipos mais plantados que é o apomítico tetraplóide, a cultivar Marandu, e um acesso sexual que é diplóide. O sistema de embriogênese somática usado para a cultivar apomítica, vem sendo desenvolvido a partir de sementes maduras. No entanto, o acesso sexual é muito ineficiente na produção de sementes, sendo necessário um método alternativo de regeneração de plantas in vitro. Apesar de haver evidências que monocotiledôneas em geral são extremamente recalcitrantes à regeneração de tecidos fotossintetizantes (CHAUDHURY e QU, 2000), em milho foi descrita a embriogênese somática a partir de folhas cultivadas in vitro (AHMADABADI et al., 2007). Este trabalho teve como objetivo testar a capacidade morfogenética de folhas de plântulas cultivadas in vitro dos acessos sexual e apomítico de *B. brizantha* pela indução de embriogênese somática.

## Material e Métodos

### Material vegetal

Plantas de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu apomítica BRA 000591 (B30) e do acesso sexual BRA 002747 (B105), cultivadas in vitro, em sala de cultura com temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  em fotoperíodo de 16 horas.

### A partir de Segmentos foliares (método alternativo)

Plantas cultivadas in vitro medindo cerca de 6 cm, dos acessos apomítico e sexual, foram selecionadas como fonte de explantes. As folhas mais jovens de cada planta foram cortadas em pedaços de 1 mm a partir da bainha, foram inoculados em meio ML1G1. O nitrato de prata e a espermidina foram adicionados ao meio após a autoclavagem. Os explantes foliares foram cultivados no escuro, na sala de cultura a  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , no período de 15, 20 e 30 dias e foram transferidos para o meio ML1C2, que difere de ML1G1 contendo apenas 10 mg/L de nitrato de prata e não conter espermidina.

### Regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos de Segmentos foliares (método alternativo)

Calos obtidos de folhas no meio ML1C2 após 10, 15 e 30 dias de cultivo no escuro, foram transferidos para o meio ML1R3, contendo a citocinina BAP; tendo sido cultivados na presença de luz a  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas. Após 30 dias os calos foram transferidos para o meio ML1R4 suplementado com a auxina ANA, no qual foram mantidos por quatro semanas.

## REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA METODOLOGIA TESTADA:

Segmentos basais cultivados in vitro em Meio B para obtenção de plântulas - fonte de explantes foliares



1 mês

Segmentos (1mm) da folha mais jovem introduzidos em meio ML1G-1 pH 4 ou 5,8 – 1º passo da Indução de embriogênese



15, 20 ou 30 dias

Explantes transferidos para meio ML1C-2 pH 4 ou 5,8 – 2º passo da indução de embriogênese



15, 10 ou 30 dias

Explantes transferidos para meio ML1R-3 pH 4 ou 5,8 – 1º passo da regeneração



30 dias

Explantes transferidos para meio ML1R-4 pH 4 ou 5,8 – 2º passo da regeneração



30 dias

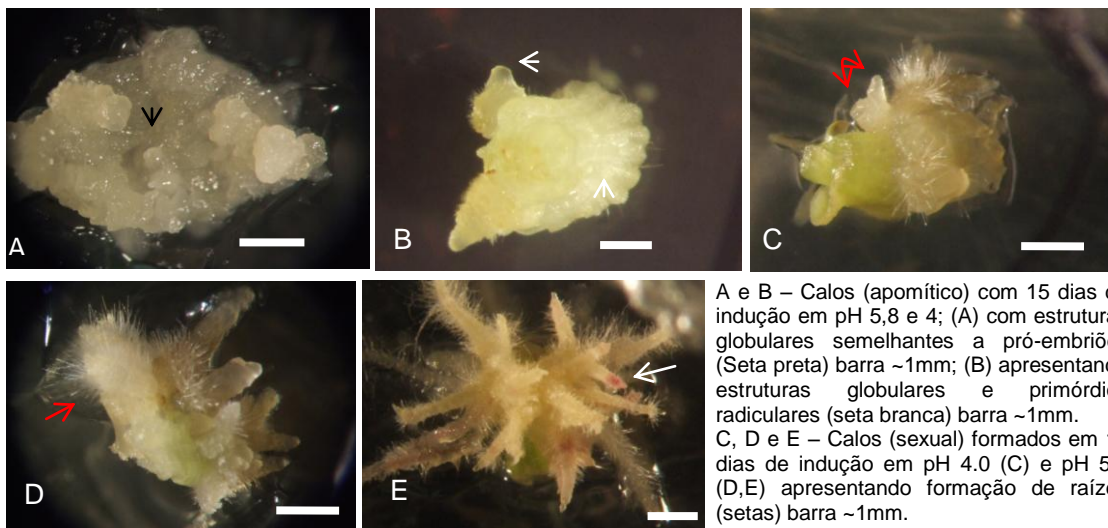
Avaliação dos explantes

## **Resultados e Discussão**

A indução e regeneração dos calos formados nos explantes foliares de ambos os acessos tanto em pH 4 ou pH 5,8 como nos 15, 20 ou 30 dias de indução apresentaram grande variação (Tabela 1). Em todos os tratamentos os calos obtidos eram friáveis, com estruturas globulares semelhantes a pró-embriões (Figura A e B ). Quando transferidos para meio de regeneração, a maioria desenvolveu raízes (Fig. C, D e E), não tendo sido observada a regeneração de embriões somáticos.

Tabela1: Resposta morfogênética de explantes foliares do acesso apomítico e sexual de *B. brizantha* cultivados em diferentes pH e intervalos de tempo de indução. Média obtida de dois experimentos.

Tratamentos		Calos formados na indução (%)		Regeneração			
				Folhas Oxidadas e Paralisadas		Folhas com calos e/ou raízes (%)	
		pH 4	pH 5,8	pH 4	pH 5,8	pH 4	pH 5,8
15 dias	Apomítico	1,6	13	40	81	8 (16,6)	23 (22)
	Sexual	15,5	16	46	61	20 (30,3)	10 (14,1)
20 dias	Apomítico	5	7,5	68	58	20 (22,7)	10 (14,7)
	Sexual	1,4	23	85	71	3 (3,4)	19 (21,1)
30 dias	Apomítico	20	18	45	60	5 (10)	9 (13)
	Sexual	28	10	47	110	11 (18,9)	15 (12)



## Conclusão

Nas condições testadas foram obtidos calos derivados de folhas de *B. brizantha*, contendo estruturas semelhantes a pró-embriões. No entanto, não foi possível regenerar embriões somáticos a partir destes calos, corroborando a afirmação de que monocotiledôneas em geral são extremamente recalcitrantes à regeneração de tecidos fotossintetizantes (CHAUDHURY e QU, 2000).

## Referências Bibliográficas

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

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