

Avaliação do Potencial Embriogênico de Sementes Maduras das Cultivares Tanzânia e Mombaça de *Panicum maximum*

*Diva Maria de Alencar Dusi*¹

*Gláucia Barbosa Cabral*²

*Renan Balduino de Oliveira*³

*Liana Jank*⁴

*Vera Tavares de Campos Carneiro*⁵

Abstract

Panicum maximum is an important forage grass that has apomictic and sexual reproduction. The development of an in vitro regeneration system for P. maximum will open the possibility of future work on genetic transformation to introduce desirable agronomic characteristics. Cultivars Tanzania and Mombaça were inoculated in one of the combination media for induction/regeneration of calluses: MSCLind/MSCLreg, NB-BAP/NBreg or MSCLind5-1/MSCLreg. In the culture conditions both cultivars formed proembryos only in the media combination MSCLind/MSCLreg, in 5% of induced explants and were observed only when they were transferred to the regeneration medium. In addition, cv. Mombaça formed shoots in this combination in 3% of the seeds transferred to regeneration medium (MSCLreg). The tested conditions for calluses, embryos and plants showed low regeneration efficiency, being necessary to test other culture conditions and callus proliferation viability and to check the maintainability of embryogenic potential thereof.

¹ Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, diva.dusi@embrapa.br

² Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, glaucia.cabral@embrapa.br

³ Estudante de graduação do curso de Agronomia da Universidade de Brasília, bad_babudo@hotmail.com

⁴ Pesquisadora da Embrapa Gado de Corte, liana.jank@embrapa.br

⁵ Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, vera.carneiro@embrapa.br

Introdução

A Embrapa Gado de Corte dispõe de coleção de germoplasma de *Panicum maximum*. Este germoplasma foi introduzido no Brasil em 1982 e foi composto por 426 acessos apomíticos e 417 plantas sexuais, sendo considerado representativo da variabilidade natural da espécie (JANK et al., 2011). A cultivar Tanzânia-1 foi lançada em 1990 e a Mombaça em 1993. Atualmente, a Embrapa Gado de Corte lidera projeto em melhoramento genético de *P. maximum* do qual a equipe da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia participa visando estabelecer técnicas de biotecnologia vegetal para futuramente serem aplicadas em experimentos de transformação genética (COSTA et al., 2009).

P. maximum é uma espécie de grande interesse agrônomo e possui plantas de reprodução apomítica e plantas de reprodução sexual. O melhoramento genético desta espécie com posterior avaliação e seleção de materiais genotípicos é essencial para se lançar e recomendar cultivares adaptadas às diversas regiões brasileiras.

Os sistemas de cultura de tecidos e transformação genética descritos na literatura para o gênero *Panicum* não são eficientes e são limitados a uma única cultivar, *P. virgatum* cv. Álamo. Existem atualmente três sistemas de cultura de tecidos publicados para *P. virgatum* cv. Álamo que são via: calos embriogênicos, calos derivados de sementes maduras e de inflorescência imatura. Algumas das limitações desses sistemas incluem a baixa longevidade da viabilidade dos calos embriogênicos obtidos, tipicamente menos do que dois meses, e a alta variabilidade genética na resposta morfogênica do sistema derivado de sementes (BURRIS et al., 2009). Dessa forma, é muito importante o desenvolvimento de um sistema de regeneração usando variedades brasileiras amplamente cultivadas no Brasil. O objetivo deste trabalho é estabelecer metodologia de regeneração *in vitro* de plantas de *P. maximum* cv. Mombaça e Tanzânia.

Material e Métodos

Cariopses maduras de *P. maximum* cv. Tanzânia e cv. Mombaça oriundas da Embrapa Gado de Corte foram descascadas com auxílio de pinças e selecionadas visualmente. Sementes foram desinfestadas por imersão em etanol 70% por 5 min, seguida de imersão em hipoclorito de sódio 2%, com duas gotas de Tween® 20, por 30 min com frequente agitação. Após esta etapa, as sementes foram lavadas por cinco vezes em água destilada esterilizada em autoclave e então colocadas sobre papel filtro esterilizado. As sementes foram inoculadas em cada um dos meios de cultura estabelecidos para indução de calos embriogênicos: MSCLind pH4, NBBAP pH4 (CABRAL et al., 2011) ou MSCLind com 5 mg/L de 2,4D e 1 mg/L de BAP (MSCLind 5/1) (Richards et al, 2001) em placas de Petri contendo 10-12 sementes. As placas foram incubadas no escuro a 25°C por três a quatro semanas. Os calos obtidos foram avaliados e posteriormente repicados para meio de regeneração, ou foram mantidos nos respectivos meios de indução, em repicagens sucessivas antes da transferência para meio de regeneração. Calos obtidos em MSCLind, NBBAP e MSCLind5/1 foram transferidos para meios de regeneração MSCLreg ou NBreg. As placas foram incubadas a 25°C e fotoperíodo de 12 horas.

Resultados e Discussão

Foram obtidos resultados referentes à resposta morfogênica das duas cultivares testadas (Tabela 1). Nas condições de cultura, tanto a cv. Tanzânia como a cv. Mombaça formaram proembriões na combinação de meio MSCLind/MSCLreg em 5% dos explantes cultivados, sendo possível visualizá-los no meio de regeneração ou quando subcultivados no meio de indução (Figura 1A). Na Tabela 2 é possível observar que quando calos induzidos de sementes maduras das cultivares Tanzânia e Mombaça são subcultivados na presença da auxina 2,4D, apresentam proembriões visíveis (Figura 1A) imediatamente após o segundo subcultivo na mesma combinação de meios MSCLind/MSCLreg. Esses proembriões estão sendo subcultivados para multipli-

cação dos calos e para confirmar a capacidade de manutenção do seu estado proliferativo, e após alguns subcultivos serão transferidos para meio de regeneração para ser observada sua capacidade de conversão em brotos verdes. A cv. Mombaça formou embriões somáticos bem diferenciados (Figura 1B) e brotos (Figura 1C) nesta combinação de meios em 3% das sementes transferidas para o meio de regeneração (MSCLreg). Em razão da baixa eficiência de regeneração, novas condições de cultura serão testadas. A cultivar Álamo de *P. virgatum* é a única desta espécie que tem metodologia publicada de regeneração e transformação genética via biobalística (RICHARDS et al., 2001) e *Agrobacterium tumefaciens* (SOMLEVA, et al., 2002). Os autores relatam uma frequência de indução de calos no meio NB (também testado neste trabalho) de 6%, que também é muito baixa. Entretanto, uma vez obtidos, os calos podem ser multiplicados para serem usados nos experimentos de transformação genética, e esta capacidade de manutenção dos calos está sendo testada para as cultivares Mombaça e Tanzânia. Concluindo, a análise dos resultados dos nossos experimentos demonstram que a combinação de meios MSCLind/MSCLreg foi a mais adequada para induzir embriogênese somática em ambas as cultivares de *P. maximum*; a germinação dos embriões somáticos foi observada na combinação de meios MSCLind/MSCLreg apenas na cultivar Mombaça; proembriões foram obtidos em ambas as cultivares quando subcultivados na combinação de meio MSCLind. Para viabilizar a transformação genética de *P. maximum* com genes de interesse agrônomicos, tais como os que conferem resistência ou tolerância a estresses bióticos e abióticos, os protocolos de indução de embriogênese e regeneração deverão ser otimizados.

Referências

BURRIS, J. N.; MANN, D. G. J.; JOYCE, B. L.; STEWART, Jr. C. N. AN IMPROVED TISSUE CULTURE SYSTEM FOR EMBRYOGENIC CALLUS PRODUCTION AND PLANT REGENERATION IN SWITCHGRASS (*Panicum virgatum* L.). **Bioenergy Research**, v. 2: p. 267-274, 2009. doi:10.1007/s12155-009-9048-8

CABRAL, G.; CARNEIRO, V.; LACERDA, A.; DO VALLE, C.; MARTINELLI, A. DUSI, D. M.

Somatic embryogenesis and organogenesis in apomictic and sexual *Brachiaria brizantha*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.107, n.2, p.271-282, 2011.

COSTA, F. P.; CORRÊA, E. S.; MELO FILHO, G. A.; CARDOSO, E. E.; PEREIRA, M. A.; MIRANDA, C. H. B. Avaliação dos impactos econômicos de quatro forrageiras lançadas pela Embrapa. **Documentos/Embrapa Gado de Corte**, ISSN 1983-974X; 174. Campo Grande, MS, 2009. 26 p.

JANK, L.; VALLE, C. B. do; RESENDE, R. M. S. Breeding tropical forages. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Special Edition - S1. p. 27-34, June 2011.

RICHARDS, H. A.; RUDAS, V. A.; SUN, H.; MCDANIEL, J. K.; TOMASZEWSKI, Z.; CONGER, B. V. Construction of a GFP-BAR plasmid and its use for switchgrass transformation. **Plant Cell Reports**, v.20: p. 48-54, 2001.

SOMLEVA, M.N.; TOMASZEWSKI, Z.; CONGER, B.V. Agrobacterium-Mediated Genetic Transformation of Switchgrass. **Crop Science**, v. 42: p. 2080-2087, 2002.

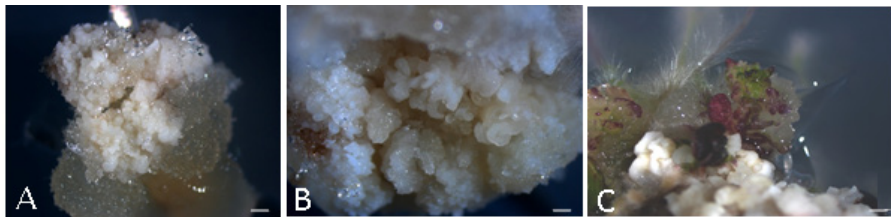


Figura 1. Resposta morfogênica de sementes de *Panicum maximum* cv. Mombaça em meio MSCLind por três semanas e em MSCLreg por quatro semanas. (A) proembriões observados após subcultivos sucessivos; (B) embriões somáticos diferenciados com escutelo e eixo embrionário distintos e presença de escutelo; (C) no primeiro plano agregados de embriões somáticos bem diferenciados, no segundo plano agregados de gemas apresentando antocianina e também raízes bem diferenciadas. Barras em A = 0,5 mm; B = 0,2 mm e C = 0,5 mm.

Tabela 1 - Resposta morfológica de sementes de *Panicum maximum* cv. Tanzânia e cv. Mombaça em meios de indução MSCLind e NBBAP e após transferência para os meios de regeneração MSCLreg e NBreg, respectivamente.

Tratamentos	total explantes inoculados	% sementes com calos	% de Calos obtidos dos tipos				
			Friável	Compacto	Com Raiz	Com Proembrião	Com broto(s)
Tanzânia							
MSCLind	309	39 ± 18	15 ± 3	33 ± 8	9 ± 6	0	0
MSCLreg	185	27 ± 2	10 ± 4	19 ± 3	24 ± 4	5 ± 2	0
NBBAP							
NBBAP	350	56 ± 19	28 ± 7	25 ± 10	6 ± 5	0,5 ± 0,7	0
NBreg							
NBreg	189	10 ± 4	6 ± 0,7	5 ± 4	7 ± 4	0	0
Mombaça							
MSCLind	210	27 ± 12	10 ± 7	14 ± 15	9 ± 2	2 ± 2	0
MSCLreg	122	34 ± 22	5 ± 6	31 ± 20	30 ± 21	10 ± 6	3 ± 4
NBBAP							
NBBAP	322	44 ± 23	40 ± 27	4 ± 4	3 ± 0,8	0	0
NBreg							
NBreg	120	14 ± 5	10 ± 7	3 ± 0 (3)	10 ± 4	0	0

Os valores referem-se às médias de 2 experimentos ± erro padrão. Os experimentos foram avaliados após 3 semanas em meio de indução e 4 semanas em meio de regeneração.

Tabela 2 - Resposta morfológica de sementes de *Panicum maximum* cv Tanzânia e cv. Mombaça cultivadas em meios de indução (MSCLind X NBBAP) por três subcultivos consecutivos.

Tratamentos	total sementes	sementes com calos (%)	Calos friáveis	Calos compactos	Com raiz	Com proem- brião (%)
Tanzânia						
MSCLind	50	5 (10)	4 (8)	2 (4)	1 (2)	0
	27	9 (33)	5 (19)	4 (15)	3 (11)	1 (4)
	12	12 (100)	11 (91)	1 (8)	5 (42)	1 (8)
NBBAP	200	8 (4)	5 (3)	3 (2)	1 (1)	0
	110	10 (9)	4 (4)	6 (5)	3 (3)	0
	75	9 (12)	7 (9)	2 (3)	1 (1)	0
Mombaça						
MSCLind	100	3 (3)	1 (1)	2 (2)	1 (1)	0
	28	9 (32)	3 (11)	6 (21)	2 (7)	2 (7)
	18	6 (33)	5 (28)	1 (6)	4 (22)	2 (11)
NBBAP	220	6 (3)	5 (2)	1 (0)	1 (0)	0
	133	10 (8)	6 (5)	5 (4)	2 (2)	1 (1)
	63	9 (14)	9 (14)	0	2 (3)	1 (2)

Todos os valores referem-se às médias das três avaliações dos tratamentos de 1 experimento (média das porcentagens). O experimento foi avaliado após três semanas no meio de indução, após cada subcultivo em meio de indução fresco.