

**OTIMIZAÇÃO DA REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE *UROCHLOA SPP.* VIA
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA**

LUCIANA MIDORI TAKAMORI

**OTIMIZAÇÃO DA REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE *UROCHLOA SPP.* VIA
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA**

LUCIANA MIDORI TAKAMORI

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre - Área de Concentração: Produção Vegetal

Orientadora:
Profa. Dra. Alessandra Ferreira Ribas

633.2
T136o

Takamori, Luciana Midori.

Otimização da regeneração *in vitro* de *Urochloa* spp. via embriogênese somática / Luciana Midori Takamori. – Presidente Prudente, 2014.
60f.: il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) -
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente
Prudente, SP, 2014.

Bibliografia.

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Ferreira Ribas

1. *Urochloa*. 2. Cultura de tecidos. 3. Regeneração.
4. Reguladores de crescimento. I. Título.

Campus I Rua José Bongiovani, 700 · Cidade Universitária · CEP 19050 920 · Presidente Prudente SP · Tel/Fax: 18 3229 1000

Campus II Rodovia Raposo Tavares, Km 572 · Bairro Limoeiro · CEP 19067 175 · Presidente Prudente SP · Tel/Fax: 18 3229 2000

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "OTIMIZAÇÃO DA REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE *UROCHLOA SPP* VIA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA"

AUTORA: LUCIANA MIDORI TAKAMORI

ORIENTADORA: ALESSANDRA FERREIRA RIBAS

Aprovado(a) como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE em AGRONOMIA

Área de Concentração PRODUÇÃO VEGETAL, pela Comissão Examinadora:

Alessandra Ferreira Ribas

Profa. Dra. Alessandra Ferreira Ribas

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente-SP

Lucélia Borgo

Profa. Dra. Lucélia Borgo

USP – Universidade de São Paulo – Piracicaba/SP

Maricília Conceição

Profa. Dra. Maricília Conceição Cardoso de Arruda

UNEMAT – Universidade do Estado de Mato Grosso – Nova Xavantina/MT

Data da realização: 05 de novembro de 2014.

Dedico este trabalho a vocês que sempre me fizeram acreditar na realização dos meus sonhos e trabalharam muito para que eu pudesse realizá-los, meus pais, Dirce e Armando.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. e orientadora Alessandra Ferreira Ribas pelos ensinamentos, incentivos, paciência e confiança ao longo das supervisões das atividades e que compartilhou o que era o broto daquilo que veio a ser esse trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira “Santista” pelos incentivos e contribuições durante as fases de desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Aos meus familiares/parentes pelo apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio ao projeto.

À Mariana Gasparim por fornecer as sementes.

As minhas amigas, Cristiane, Lucimara e Rosemar pelas ajudas e pelos momentos de alegria e tristeza compartilhadas. Com vocês, as pausas para cafés, almoço e “férias” foram bem descontraídas e assim os dias passaram mais rápido.

Aos colegas de laboratório pela convivência.

Aos professores e funcionários pelo convívio e auxílio neste período.

À todos que contribuíram de alguma forma no meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Meus sinceros agradecimentos a todos.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.” Albert Einstein.

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.” Leonardo da Vinci.

RESUMO

Otimização da regeneração *in vitro* de *Urochloa* spp. via embriogênese somática

O estabelecimento de uma metodologia eficiente para regeneração *in vitro* de *Urochloa* spp. via embriogênese somática é essencial para trabalhos de manipulação genética e, para dar suporte ao melhoramento do capim braquiária. O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes concentrações de reguladores de crescimento na indução de calos, embriões somáticos e na regeneração de plantas de *Urochloa* spp., utilizando sementes maduras como explante inicial. Inicialmente, foram testados quatro tratamentos contendo 2,4-D ou picloram, nas concentrações de 1, 2, 4 e 8 mg/L usando a cultivar Marandu (1cultivar x 2 reguladores x 4 concentrações x 12 repetições). Posteriormente, as mesmas concentrações de picloram foram testadas para as cultivares Xaraés e Piatã de *U. brizantha* e para as espécies de *U. decumbens* cv. Basilisk, *U. humidicola* cv. Llanero e *U. ruziziensis* cv. Ruziziensis (6 cultivares x 1 regulador x 4 concentrações x 12 repetições). Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento, sendo que cada repetição foi composta por uma placa contendo 10 sementes cada. Os experimentos foram repetidos três vezes. As sementes foram desinfestadas em NaOCl a 5% contendo três gotas de Tween 20, lavadas cinco vezes em água destilada esterilizada e inoculadas em meio MS contendo as diferentes concentrações dos reguladores de crescimento. Os experimentos foram mantidos em câmara de crescimento a 25 °C $\pm$ 2 °C, na ausência de luz, sendo sub-cultivados a cada 14 dias até o surgimento de calos embriogênicos. Estes calos foram transferidos para o meio MS sem adição de fitorreguladores por 14 dias, em luz indireta e, em seguida, transferidos para o meio MS/2 contendo 2 mg/L de BA, sob luz direta, com fotoperíodo de 16 horas para regeneração de plantas. Foram analisados o número de sementes que produziram calos primários, número de calos que produziram brotos e número de plantas regeneradas. Os diferentes tipos de calos produzidos foram avaliados citoquimicamente por meio da dupla coloração com Carmim acético e azul de Evans para certificar a competência embriogênica. Para a *U. brizantha* cv Marandu não houve diferença significativa entre os tratamentos para o percentual médio de sementes que produziram calos primários variando de 58,5% a 69,2%. Calos embriogênicos induzidos com o regulador de crescimento picloram certificaram o maior percentual de formação de brotos diferindo significativamente daqueles induzidos sob 2,4-D. O maior número de plantas regeneradas foi observado na concentração de 1 mg/L de picloram para os genótipos *U. decumbens* cv. Basilisk, *U. brizantha* cv. Marandu e Xaraés e não apresentando diferença significativa entre eles. Plantas verdes e morfológicamente normais foram regeneradas e aclimatizadas, abrindo a possibilidade do uso deste protocolo para obtenção de plantas transgênicas em *Urochloa* spp.

Palavras-chave: *Urochloa*. Cultura de tecidos. Regeneração. Reguladores de crescimento.

ABSTRACT

Optimization of *in vitro* regeneration of *Urochloa* spp via somatic embryogenesis

The establishment of an efficient methodology for regeneration in *Urochloa* spp via somatic embryogenesis is an essential step for genetic engineering works and to support the breeding programs of the signal grass. The aim of this study was to evaluate different concentrations of growth regulators on callus induction, somatic embryogenesis and plant regeneration of *Urochloa* spp. using mature seeds as the initial explant. Firstly, eight treatments were tested containing different concentrations (1, 2, 4 and 8 mg L⁻¹) of 2,4-D or picloram, using Marandu cultivar. After, the same concentrations of picloram were tested for others genotypes: cultivars Xaraés and Piata of *U. brizantha*, *U. decumbens* cv. Basilisk, *U. humidicola* cv. Llanero and *U. ruziziensis* cv. Ruziziensis. The experiments were conducted in a completely randomized design with four replications per treatment, and each replicate consisted of a petri dish containing 10 seeds each. The experiments were repeated three times. Seeds were sterilized in 5% NaOCl containing three drops of Tween 20, washed five times in sterile distilled water and inoculated onto MS medium containing the treatments described above. The experiments were maintained in growth chamber at 25 ° C ± 2 ° C in the dark, and sub-cultured every 14 days until the emergence of embryogenic calluses. To induce plant regeneration, these calluses were transferred to hormone-free MS medium for 14 days in indirect light followed by transfer to MS/2 medium containing 2 mg/L BA in direct light with a photoperiod of 16 hours. The number of seeds that produced primary calluses, the number of calluses with shoots and the number of regenerated plants were analyzed in each treatment. To demonstrate embryogenic competence, the different calluses types were cytochemically analyzed by double staining with acetic carmine and Evans blue. There was no significant difference between concentration of 2,4D or picloram for production of primary calluses of *U. brizantha* Marandu ranging from 58.5% to 69.2%. Calluses induced under picloram showed the highest percentage of shoot formation differing significantly from those induced under 2.4D. The genotypes *U. decumbens* cv. Basilisk, *U. brizantha* cv. Marandu and Xaraés showed the significant highest number of regenerated plants at 1 mg/L picloram. Green and morphologically normal plants were regenerated and acclimatized, opening the possibility of using this protocol to obtain transgenic plants in *Urochloa* spp.

Keywords: *Urochloa*. Tissue culture. Regeneration. Growth regulators.

LISTA DE SIGLAS

2,4-D - Ácido Diclorofenoxiacético

ANA - Ácido Naftaleno Acético

BAP – 6 Benzilaminopurina

CC – calos compactos

CE – calos embriogênicos

CMM – Célula-mãe do megásporo

CMP - Célula-mãe do grão de pólen

CP – calos primários

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

GA3 – Ácido Giberélico

MS – meio Murashige e Skoog

MS/2 – com metade da concentração de nutrientes minerais do meio MS

NaOCl – Hipoclorito de sódio

PEM – Massas Pró-embriogênicas

Picloram - Ácido 3,5,6-tricloro -4-amino-2-piridinocarboxílico

TDZ - thidiazuron

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Esquema da reprodução sexual e apomítica (apospórica) em *Urochloa spp.* CMM: célula-mãe do megásporo; CMP: célula-mãe do grão de pólen.....19
- FIGURA 2 - Análise citoquímica dos diferentes tipos de calos de *U. brizantha* cv. Marandu produzidos *in vitro*. (A) calo primário (CP), caracterizado como estrutura friável, não embriogênico; (B) calo embriogênico (CE), caracterizado como globulares e transparentes, (C) estrutura compactos (EC), formados a partir de calos primários. Teste usando Carmim acético para confirmar a formação de células embriogênicas, 30 dias após a inoculação no meio de indução. (D) calos não embriogênicos, (E e F) calos embriogênicos. Círculos vermelhos em A, B e C indicam o local de amostragem do calo. Barras: A, B e C = 25 mm; D, E e F = 100µM.....37
- FIGURA 3 - Etapas do desenvolvimento de calos embriogênicos e regeneração de plantas em *U. brizantha* cv Marandu. A– Sementes maduras. B- CP: Calos Primários. C- CE: Calos Embriogênicos (seta vermelha). D- EC: Estruturas compactas. E e F- Formação de brotos. G- Formação de plantas regeneradas. H- Processo de aclimatização. Barras: A, F, G e H: 10mm; B: 1mm; C, D e E: 5 mm.....39
- FIGURA 4 - Diferentes modificações das estruturas dos calos produzidos em meio MS contendo 8 mg/L de 2,4-D ou picloram. A- Calo com pigmentação arroxeada. B- Calo oxidado. C- Calo com formação de raízes. Barra: 5 mm.....41
- FIGURA 5 - A- Plantas albinas regeneradas em 8 mg/L de 2,4-D (setas vermelhas); B- Plantas albinas. Barra: 10 mm.....42

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 - Procedência das sementes de *U. brizantha* (Marandu, Xaraés e Piatã), *U. decumbens* (Basilisk), *U. humidicola* (Llanero) e *U. ruziziensis* (Ruziziensis) utilizadas no experimento. SAFRA 2012/2013.....32
- TABELA 2 - Porcentagem de formação de calos, brotos e total de plantas regenerados derivados de calos de sementes maduras de *U. brizantha* cv Marandu usando diferentes concentrações de 2,4-D e picloram.....38
- TABELA 3 - Porcentagem de formação de calos primários derivados de sementes maduras de *U. brizantha* (Marandu, Xaraés e Piatã), *U. decumbens* (Basilisk), *U. humidicola* (Llanero) e *U. ruziziensis* (Ruziziensis) usando diferentes concentrações de picloram.....45
- TABELA 4 - Porcentagem de formação de brotos derivados de calos primários de *U. brizantha* (Marandu, Xaraés e Piatã), *U. decumbens* (Basilisk), *U. humidicola* (Llanero) e *U. ruziziensis* (Ruziziensis) usando diferentes concentrações de picloram.....46
- TABELA 5 - Total de plantas regeneradas a partir de calos primários derivados de sementes maduras de *U. brizantha* (Marandu, Xaraés e Piatã), *U. decumbens* (Basilisk), *U. humidicola* (Llanero) e *U. ruziziensis* (Ruziziensis) usando diferentes concentrações de picloram.....47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	OBJETIVOS.....	16
2.1	Objetivo geral.....	16
2.2	Objetivo específico.....	16
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3.1	Gênero <i>Urochloa</i>	17
3.1.1	Modo de reprodução.....	17
3.1.2	Características agronômicas das principais cultivares comerciais de <i>Urochloa spp</i>	20
3.2	Cultura de tecidos.....	23
3.2.1	Meios de cultura.....	26
3.3	Regeneração <i>in vitro</i> do gênero <i>Urochloa</i>	29
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1	Material Vegetal.....	32
4.2	Meio de cultura e condições de cultivo.....	33
4.3	Análise citoquímica dos calos.....	34
4.4	Enraizamento e aclimatização.....	34
4.5	Análise estatística.....	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1	Análise citoquímica dos diferentes tipos de calos de <i>Urochloa</i>	36
5.2	Indução de calos embriogênicos e regeneração de plantas em <i>U. brizantha</i> cv Marandu	38
5.3	Regeneração <i>in vitro</i> em outros genótipos de <i>Urochloa</i> usando picloram.....	44
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	49
	REFERÊNCIAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Urochloa* (syn. *Brachiaria*) tem como centro de origem primária a África Equatorial, apresentando cerca de 100 espécies, as quais são comumente denominados de braquiária e com distribuição, marcadamente, tropical (KELLER-GREIN; MAASS; HANSON, 1996). Estas espécies de gramíneas foram introduzidas na América do Sul no século XVIII (MILES; MAASS; VALLE, 1996). No Brasil, existem 40 milhões de hectares cultivados com espécies de *Urochloa* (MONTANARI *et al.*, 2013) e, aproximadamente 210 milhões de cabeças de gado são alimentados com pastagens desse gênero (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2013).

O melhoramento genético em espécies do gênero *Urochloa* é realizado por meio do cruzamento entre indivíduos sexuais e apomíticos superiores, e envolve principalmente três espécies: *U. ruziziensis* (diplóide), como fonte de sexualidade, e *U. brizantha* ou *U. decumbens* (tetraplóides) como doadoras de pólen. Apesar da afinidade entre as espécies neste complexo agâmico, diferenças no nível de ploidia tornam difícil a obtenção de híbridos viáveis (VALLE *et al.*, 2008). Deste modo, novas abordagens devem ser desenvolvidas para a obtenção de cultivares com características agronômicas desejadas. A cultura de tecidos *in vitro*, é uma ferramenta usada para acelerar os vários processos biotecnológicos, tais como a melhoria da frequência de regeneração de plantas, indução de variabilidade e a transformação genética. Em particular, a embriogênese somática tem um grande potencial como sistema modelo para o estudo de processos fisiológicos, bioquímicos, moleculares e morfológicos em plantas superiores (CASTRO *et al.*, 2010). No entanto, vários fatores, tais como o tipo e concentração de reguladores de crescimento, idade fisiológica, tamanho de explantes, meios de cultura e condições de cultura podem influenciar o potencial regenerativo das espécies e até mesmo das cultivares (MILACHI *et al.*, 1991).

Até o momento, poucos exemplos de regeneração de plantas em espécies do gênero *Urochloa* foram demonstrados e a frequência de indução de calos embriogênicos ainda é considerada baixa, somente cerca de 20% dos calos regeneraram plantas em *U. brizantha* (CABRAL *et al.*, 2011) e 30% em *U. ruziziensis* (ISHIGAKI *et al.*, 2009). Este protocolo foi, posteriormente, utilizado para o bombardeamento dos calos com o gene GUS, demonstrando ser possível a obtenção

de plantas transgênicas de *U. ruzizienses* (ISHIGAKI et al., 2012). Porém, somente duas plantas foram regeneradas.

A otimização do protocolo para a regeneração *in vitro* de plantas em espécies do gênero *Urochloa* abrirá novas possibilidades para introdução de características agronômicas, via transformação genética, nessas importantes gramíneas forrageiras.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Otimizar um protocolo para regeneração *in vitro* em cultivares comerciais do gênero *Urochloa*, utilizando sementes maduras e os indutores 2,4-D e picloram.

2.2 Objetivo específico

- Determinar a melhor concentração de reguladores de crescimento para estabelecimento *in vitro* em cultivares comerciais de quatro espécies de *Urochloa*: *U. brizantha* (Hochst.) (cv. Marandu, Piatã, Xaraés), *U. decumbens* (cv. Basilisk), *U. humidicola* (Rendel) Schnwickerdt (cv. Llanero) e *U. ruziziensis* (cv. Ruziziensis), via embriogênese somática, utilizando sementes maduras como explantes iniciais.

- Avaliar citoquimicamente diferentes tipos de calos.
- Analisar número de sementes para produção de calos das espécies.
- Analisar o número de calos que produziram brotos; e
- Analisar o número de plantas regeneradas das cultivares do gênero

Urochloa.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Gênero *Urochloa*

O gênero *Urochloa* P. Beauv. spp. (syn. *Brachiaria* (Trin.) Griseb. spp.) pertence à tribo Paniceae da família Poaceae, com cerca de 100 espécies que ocorrem em áreas tropicais e subtropicais, principalmente, na África (RENVOIZE; CLAYTON; KABUYE, 1996). As braquiárias crescem em uma ampla gama de *habitats* de pântanos a floresta sombreada, semi-deserto, mas são comumente encontradas nas savanas. O interesse agrônômico de várias espécies desse gênero é para o uso como forrageira tropical (RENVOIZE; CLAYTON; KABUYE, 1996). No Brasil, as principais sementes de pastagens comercializadas são: *U. brizantha*, *U. decumbens*, *U. humidicola* e *U. Ruziziensis*, as quais representam 87% do mercado nacional (KARIA; DUARTE; ARAÚJO, 2006).

3.1.1 Modo de reprodução

Urochloa spp. caracteriza-se por apresentar a maioria das espécies poliploides, com o número básico de cromossomos $x=7$ ou $x=9$. O nível de ploidia é bastante variável em algumas dessas espécies, das quais as mais importantes são: *U. brizantha* ($2n = 2x = 18$; $2n = 4x = 36$; $2n = 5x = 45$; ou $2n = 6x = 54$); *U. decumbens* ($2n = 2x = 18$; $2n = 4x = 36$); *U. humidicola* ($2n = 4x = 36$; $2n = 6x = 54$); e *U. ruziziensis* ($2n = 2x = 18$) (VALLE; SAVIDAN, 1996).

As braquiárias apresentam dois modos de reprodução, um sexual e outro apomítico facultativo, sendo este último o mais frequente, principalmente, nas cultivares comerciais como em *U. brizantha* (VALLE; GLIENKE, 1991). No Brasil, a maior parte da área cultivada com gramínea forrageira do gênero *Urochloa* é coberta por apenas duas cultivares apomíticas e tetraplóides, as espécie: *U. brizantha* (Hochst.) cv. Marandu e *U. decumbens* Stapf cv. Basilisk (SIMIONI; VALLE, 2009).

Enquanto a reprodução sexual gera variabilidade genética na progênie pela fusão de gametas reduzidos (n), na apomixia ou agamospermia ocorre a produção de embriões e sementes viáveis originários do nucelo não reduzido ($2n$), originando clones da planta-mãe (CABRAL et al., 2006). A apomixia é observada em

mais de 35 famílias de plantas, incluindo mais de 300 espécies de angiospermas (HANNA; BASHAW, 1987), em gramíneas a apomixia está associada à poliploidia (CARNAHAN; HILL, 1958; VALLE; GLIENKE; LEGUIZAMON, 1994; PENTEADO et al., 2000).

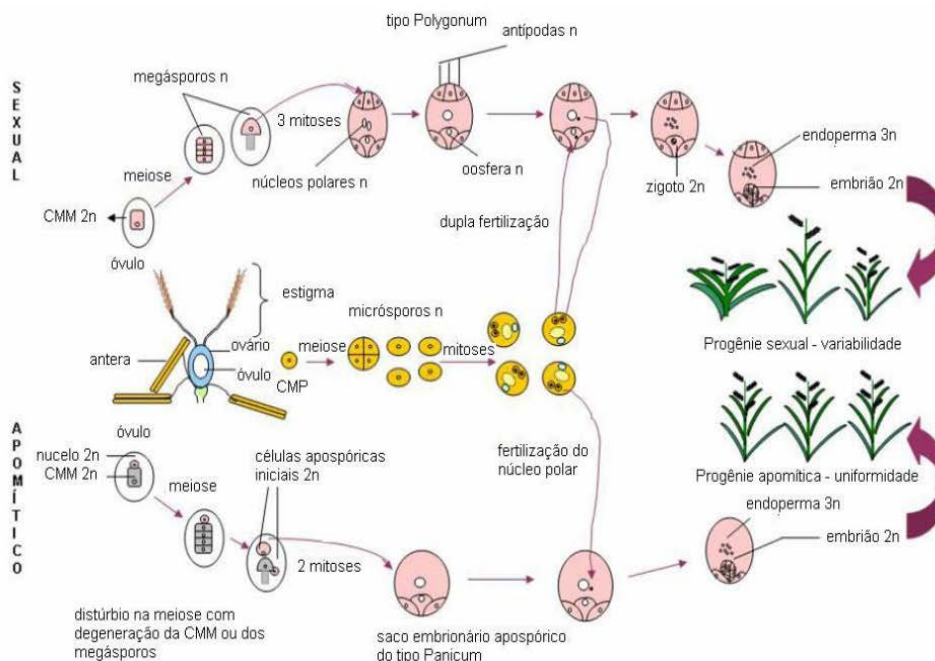
Em *Urochloa* a apomixia é do tipo aposporia, na qual o saco embrionário, não reduzido, é originado de células somáticas do ovário, das células do nucelo, que se diferenciam em “iniciais apospóricas” (ARAUJO et al., 2000; ALVES; CARNEIRO; ARAUJO, 2001; DUSI et al., 2004) (Figura 1). Além disso, ela é classificada como apospórica pseudogâmica, na qual a polinização é necessária para a fertilização do núcleo polar e a formação do endosperma. O embrião, no entanto, desenvolve-se de modo autônomo, diretamente do nucelo não reduzido (ARAUJO et al., 2000; ALVES; CARNEIRO; ARAUJO, 2001). A viabilidade dos grãos de pólen das plantas apomíticas permite que elas sejam usadas para fecundação de plantas sexuais, em programas de melhoramento. No entanto, diferenças de ploidia entre as plantas sexuais (diploides) e apomíticas (poliploides) dificultam a obtenção de novas combinações gênicas (VALLE et al., 2004).

Dos 275 acessos naturais de *U. brizantha* já caracterizados, apenas um foi classificado como sexual, sendo o mesmo diplóide (BRA002747) e o restante classificado como apomíticos apospóricos facultativos. Se por um lado a reprodução apomítica tem a desvantagem de não gerar variabilidade genética em plantas, naturalmente apomíticas, por outro lado, o uso controlado da apomixia na agricultura permite fixar genótipos elite e híbridos de qualidade e propagá-los por sementes (CARNEIRO; DUSI, 2002). Essas sementes poderão ser produzidas por muitas gerações sem perder o vigor ou ter alteração de genótipo, isso seria importante para a redução dos custos de produção, principalmente, para pequenos agricultores, uma vez, que boa parte dos gastos iniciais da implantação de uma cultura refere-se à aquisição de sementes (KOLTUNOW; BICKNELL; CHAUDHURY, 1995).

Entretanto, os melhoristas enfrentam restrições devido às plantas apomíticas serem poliplóides, mais comumente tetraplóides e, às plantas sexuais serem diplóides. Para isso, o número de cromossomos da planta sexual deve ser dobrado antes do cruzamento ou a duplicação cromossômica deve ser realizada em híbridos triplóides (VALLE et al., 2008). Além da barreira da diferença de ploidia e, da reprodução apomítica não gerar variabilidade genética, as plantas apomíticas

podem ser utilizadas apenas como doadoras de pólen, como progenitor masculino (VALLE; GLIENKE; LEGUIZAMON, 1994).

Figura 1: Esquema da reprodução sexual e apomítica (apospórica) em *Urochloa spp.* CMM: célula-mãe do megásporo; CMP: célula-mãe do grão de pólen.



Fonte: (CARNEIRO; DUSI, 2002).

Assim, a baixa variabilidade genética das pastagens brasileiras, constituídas, principalmente, por plantas apomíticas, torna-as mais vulneráveis a doenças e pragas (ARAUJO et al., 2000). As únicas fontes de diversidade dessa população apomítica facultativa são mutações somáticas ou ocorrência de fecundação nos sacos embrionários do tipo *Polygonum*, característicos de plantas sexuais (OZIAS-AKINS, 2006; TUCKER; KOLTUNOW, 2009). Por exemplo, no caso de *U. brizantha* cv. Marandu apenas 2% dos sacos embrionários são deste tipo, enquanto os demais são do tipo *Panicum*, característicos de apomíticos apospóricos. A progênie resultante da reprodução apomítica é constituída por clones idênticos à planta-mãe, o que implica baixa diversidade genética. Portanto, novas abordagens para o melhoramento das forrageiras apomíticas, tais como a transgenia, poderá ser uma opção para a introdução de características agronômicas de interesse.

3.1.2 Características agronômicas das principais cultivares comerciais de *Urochloa spp.*

A *U. brizantha* (Hochst. ex. A. Rich) Stapf. é uma gramínea perene, apresentando folhas com lâminas lineares lanceoladas, pilosas na face ventral e glabras na face dorsal, apresentando pêlos na porção apical dos entrenós e bainhas, na porção laminar são largas e longas (MOREIRA; BRAGANÇA, 2010). A inflorescência pode atingir até 40 cm de comprimento, normalmente com 4 a 6 ráculos, equidistantes ao longo da ráquia, medindo de 7 a 10 cm de comprimento, podendo chegar até 20 cm em plantas muito vigorosas. Em relação à altura pode atingir de 1,5 a 2,5 metros, apresentando colmos prostrados, mas produzindo perfilhos cada vez mais eretos ao longo do crescimento da touceira, com perfilhamentos mais intensos nos nós superiores, promovendo a multiplicação de inflorescências, principalmente sob o regime de pastejo ou corte (NUNES et al., 1984; MEDEIROS, 2004). Apresenta fruto do tipo cariopse o qual é a unidade de propagação da espécie (MOREIRA; BRAGANÇA, 2010). Possui sistema radicular vigoroso e profundo, apresenta elevada tolerância à deficiência hídrica e absorção de nutrientes em camadas mais profundas do solo, desenvolvendo-se em condições ambientais em que a maioria das culturas produtoras de grãos e das espécies utilizadas para cobertura do solo, não se desenvolveriam bem (BARDUCCI et al., 2009).

A cultivar Marandu foi liberada pela Embrapa, em 1983, para atender a demanda por cultivares resistentes à cigarrinha-das-pastagens, e é hoje a pastagem mais plantada no Brasil (ARAÚJO; DEMINICS; CAMPOS, 2008). A *U. brizantha* cv. Marandu apresenta ampla utilização devido à elevada produção de forragem, boa capacidade de rebrota, tolerância à seca e persistência (MEIRELLES; MOCHIUTTI, 1999). Esta forrageira se desenvolve bem em climas tropicais, caracterizados como tendo duas estações climáticas bem definidas, uma seca e a outra chuvosa, além de se adaptar bem a solos de média e baixa fertilidade ou de textura arenosa, e tolerar altas saturações de alumínio (ALVES; FILHO, 1996). Apresenta média proteção dos solos, podendo ser indicada para áreas de relevo plano a ondulado. Tem boa tolerância ao sombreamento, rebrota após queimada e a seca. É considerada resistente a cigarrinha das pastagens e a formigas cortadeiras. Não tolera solos encharcados e é suscetível a geadas (EMBRAPA GADO DE CORTE, 2008).

A *U. brizantha* cv. Xaraés foi lançada pela Embrapa Gado de Corte em 2002, apresenta boa adaptação aos solos de Cerrado de média fertilidade, boa resposta à adubação, é tolerante a fungos foliares e de raiz, seu florescimento é intenso, rápido e concentrado no outono e apresenta produtividade anual média de 120 kg.ha⁻¹ de sementes puras (VALLE et al., 2004). Embora promova desempenho animal inferior ao obtido com a cultivar Marandu, ela possui vantagens, como maior velocidade de rebrota e produção de forragem, o que garante maior taxa de lotação e resulta em melhor produtividade por área (EUCLIDES et al., 2008, 2009).

A *U. brizantha* cv. BRS Piatã foi lançada pela Embrapa Gado de Corte, em 2007, é uma opção de forrageira para o sistema de Integração Lavoura-Pecuária (ILP) por apresentar crescimento lento na fase inicial, fator que favorece a sua implantação em consórcio com culturas anuais, como milho e sorgo. Segundo Almeida et al. (2010), a estratégia de uso do consórcio de sorgo de corte e pastejo com capim-piatã para pastejo antecipado e do capim-piatã em monocultivo para pastejo tardio, tem potencial para melhorar o escalonamento de produção de forragem de boa qualidade no outono-inverno e propiciar palhada e cobertura do solo adequada, para o plantio direto subsequente. Dentre as vantagens do uso do capim-piatã nos sistemas de produção animal a pasto são: produção de forragem de melhor qualidade, maior produção de folhas e talos mais finos, precocidade produtiva, maior tolerância à umidade do solo em relação ao capim-marandu; maior resistência a cigarrinha-das-pastagens quando comparado com o capim-xaraés (EMBRAPA GADO DE CORTE, 2008).

A *U. decumbens* cv. Basilisk, atualmente, forma extensos monocultivos nos cerrados brasileiros. A boa adaptabilidade aos solos ácidos e pobres, a fácil multiplicação por sementes, associada à agressividade na competição com invasoras e o bom desempenho animal, comparado às pastagens nativas, explicam a rápida expansão dessa braquiária nos trópicos. Problemas com as cigarrinhas-das-pastagens, que dizimaram essas pastagens na Amazônia, a fotossensibilização, especialmente, em bezerros desmamados e, as extensas áreas de pastagens degradadas, associadas ao manejo indevido, são os principais problemas dessa variedade (RESENDE et al., 2008).

A *U. humidicola* cv. Llanero adapta-se bem a solos ácidos e de baixa fertilidade, é tolerante à seca e recupera-se bem depois de queimadas. Tem boa tolerância à cigarrinha-das-pastagens, boa capacidade de rebrota e boa

palatabilidade. Ataques esporádicos de cigarrinha podem ocorrer, principalmente, em áreas manejadas com baixas lotações de animais, sendo que a pastagem normalmente se recupera satisfatoriamente. O estabelecimento é lento devido ao escasso enraizamento dos estolões, sendo recomendada maior densidade de sementeira em áreas com alta infestação de plantas invasoras. Esta espécie caracteriza-se por uma cobertura inicial baixa do solo, em consequência, o estabelecimento é lento. Seu crescimento estolonífero rizomatoso permite uma proteção eficiente do solo e apresenta boa persistência a pastoreio excessivo. Llanero tem mostrado boa compatibilidade com leguminosas de hábito trepador ou estolonífero. O hábito de crescimento ereto, desta gramínea, e seu lento desenvolvimento favorecem o estabelecimento simultâneo com leguminosas forrageiras (EMBRAPA GADO DE CORTE, 2008).

A *U. ruziziensis* é também conhecida por "Congo signal grass", "Congo grass", "Ruzi grass", "ruzigrass" e "Kennedy Ruzi grass". As características morfológicas da *U. ruziziensis* descrevem uma planta perene, rasteira, formando tufos com uma densa cobertura de folhas crescendo de 1 a 1,5 m de altura, com a base decumbente, tendo espiguetas em 1 ou 2 linhas de um lado da ráquis. As espiguetas são pilosas na parte apical, bisseriadas ao longo da ráquis e com aproximadamente 5 mm de comprimento. Apresenta rizomas curtos e fortes, em forma de tubérculos arredondados de até 15 mm de diâmetro, talo piloso, folhas lineares e lanceoladas. A espécie é originária da África, onde ocorre em condições úmidas e não inundáveis, tendo sido encontrada no Zaire, Burundi e oeste do Kenya. Foi cultivada inicialmente no Congo (Zaire), onde junto com *Setaria anceps*, forma a base das pastagens cultivadas (EMBRAPA GADO DE CORTE, 2008).

Segundo Serrão e Simão Neto (1971) esta espécie emana um odor peculiar, semelhante ao capim gordura (*Melinis minutiflora* Beauv.). A *U. ruziziensis* é uma forrageira de alta qualidade nutricional, com potencial para uso na diversificação das pastagens brasileiras. No Brasil, foi introduzida na década de 1960, vinda da Austrália, embora seja originária da África. Essa planta possui muita boa palatabilidade e digestibilidade, é bem precoce, com boa velocidade de rebrota, níveis de proteína variáveis entre 11 e 13%, de acordo com as estações do ano. É indicada especialmente para bovinos, embora equinos, ovinos e caprinos a consumam. O crescimento é rápido no início da temporada de chuvas e apresenta compatibilidade no consórcio com leguminosas. Muitos agricultores têm utilizado a

U. ruziziensis em áreas de cultivo de soja para cobertura vegetal, no período de entressafra da cultura e como pasto no inverno. A espécie é bem adaptável para sistemas de integração Lavoura-Pecuária-Floresta (LPF) como cobertura de solo para o plantio direto, com menos exigências de herbicida para dessecação. A praga mais problemática para o cultivo de pastos de *U. ruziziensis* é a cigarrinha, que é uma praga conhecida dos trópicos. (VALLE; SAIDVAN, 1996). A *U. ruziziensis* cv. Ruziziensis é considerada uma excelente forrageira tropical e tem sido utilizada como uma das principais espécies que compõem o Sistema de Integração Lavoura-Pecuária (ILP). Sua implantação tem visado tanto a formação de pastagens para a alimentação animal (MACEDO, 2009), quanto a formação de palhada para o sistema de plantio direto, garantindo, assim, maior sustentabilidade ao ambiente (TORRES; PEREIRA; FABIAN, 2008; MACHADO; ASSIS, 2010). A *U. ruziziensis* tem sido intensamente utilizada em consórcio com a cultura do milho, podendo ser semeada concomitantemente ou posteriormente a emergência da cultura (JAKELAITIS et al., 2005; PEREIRA et al., 2009; JAKELAITIS et al., 2010).

3.2 Cultura de tecidos

De acordo com Torres et al. (1998), os primeiros trabalhos com cultura de tecido vegetal datam do início do século passado, quando Haberlandt, em 1902, tentou o cultivo, sem êxito, de células de tecidos somáticos de várias espécies de plantas em solução nutritiva. A cultura de tecidos, também referida como célula, *in vitro*, axênica, ou cultura estéril, é uma ferramenta importante, tanto básico e estudos aplicados, bem como na aplicação comercial (THORPE, 1990).

A embriogênese somática constitui um exemplo da expressão da totipotência das células das plantas, ou seja, qualquer célula contém informações genéticas necessárias e pode regeneração de uma planta completa (KRIKORIAN; BERQUAM, 1969). Em geral, quase todas as partes da planta podem ser usadas como explante inicial na indução da embriogênese somática: ápices caulinares, discos foliares, segmentos foliares, inflorescências e raízes, dentre outros (CHU et al., 1984).

A regeneração de plantas *in vitro* pode ocorrer por embriogênese somática ou organogênese. Podendo ser direta (sem a produção de calos) ou

indireta quando o processo de regeneração é precedido pela formação de calo. A partir de células não-organizadas do calo, surgem gemas adventícias ou embriões somáticos que crescem e se desenvolvem em novas plantas. A maior vantagem de se usar o método indireto como ferramenta para a produção de massa clonal e regeneração de plantas, é o seu potencial de desenvolver altas taxas de multiplicação, reproduzindo grandes quantidades de plantas uniformes (THORPE; HARRY; KUMAR, 1991).

A embriogênese somática é uma ferramenta valiosa em biotecnologia de plantas, sendo que a possibilidade da transferência de genes visando o melhoramento das espécies é uma das principais aplicações dessa técnica. O protocolo mais comumente utilizado para a indução de embriogênese envolve a indução de calos em um meio suplementado com auxina e o desenvolvimento de embriões somáticos mediante transferência dos calos para um meio com baixa concentração de reguladores de crescimento (DEO et al., 2010). A embriogênese somática indireta divide-se em duas fases, primeiro há uma fase de desdiferenciação das células do explante, seguida da ativação da divisão e proliferação celular, que levam à formação de calos e, na segunda fase, ocorre o desenvolvimento de embriões a partir de determinadas células do calo (WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986; SWEBY; HUCKETT; WATT, 1994; GAJ, 2004).

Para que ocorra a embriogênese somática é necessário que a célula sofra uma indução, pois as células somáticas não são naturalmente embriogênicas (NAMASIVAYAM, 2007). Altas concentrações de auxinas alteram, rapidamente, o metabolismo das células dos explantes, resultando no desenvolvimento de calos (DUDITS et al., 1995). É das células competentes, ou seja, aquelas que se mostram sensíveis aos fatores de indução e capazes de desenvolver a embriogênese somática, que se formam os embriões (GAJ, 2004).

A embriogênese somática pode ser descrita como o processo pelo qual células somáticas desenvolvem estruturas semelhantes a embriões zigóticos, por meio de uma sequência ordenada de estádios embriogênicos característicos, sem ocorrência de fusão dos gametas (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999; JIMÉNEZ, 2001). Durante o seu desenvolvimento, embriões somáticos passam por estádios similares àqueles observados na embriogênese zigótica, caracterizando-se como estrutura bipolar sem nenhuma conexão vascular com o tecido materno (DURZAN, 1988; VICIENT; MARTINEZ, 1998).

Em monocotiledôneas, especialmente nas espécies de gramíneas, a embriogênese somática segue uma sequência de eventos morfológicos, os quais ocorrem simultaneamente, desde o estágio globular até fases posteriores do desenvolvimento embrionário. Isso inclui o desenvolvimento do escutelo, o início da formação do coleóptilo, diferenciação dos tecidos e acúmulo de substâncias de armazenamento intracelulares. Na fase final de maturação dos embriões, o coleóptilo sofre alargamento e o eixo embrionário desenvolve-se lateralmente e paralelamente ao escutelo, enquanto o meristema apical da raiz é incorporado e o meristema apical desenvolve-se externamente protegido pelo coleóptilo (GRAY, 1996).

In vitro, a competência embriogênica celular, em geral, manifesta-se após a mudança de uma ou mais condições de cultivo como meio de cultura, composição de reguladores de crescimento vegetal, fonte de carboidrato, potencial osmótico, dentre outras. Após essas alterações, células ou tecidos induzidos alcançam a segunda fase ou fase de expressão, na qual as células se diferenciam em embriões somáticos revelando sua competência embriogênica (JIMENEZ, 2005). A capacidade de induzir embriões somáticos está sob controle genético, de forma que genótipos de uma determinada espécie podem diferir no seu potencial embriogênico (MAY; TRIGIANO, 1991; VAN DER VALK; PEDERSON; DAVIS, 1992; BERED et al., 1996; LAMB et al., 2002; SUN et al., 2003).

Apesar dos avanços verificados no estudo da embriogênese somática, ainda é limitada a compreensão dos estímulos e condições necessárias para a indução e controle desse processo. A possibilidade de manipulação deste sistema experimental para fins tecnológicos depende do domínio preciso de princípios de fisiologia do desenvolvimento. Desta maneira, morfogênese pode ser conceituada como a integração entre os processos decorrentes da divisão e diferenciação celular. Por determinação celular define-se o processo pelo qual o potencial de desenvolvimento de uma célula torna-se limitado a uma rota específica (CHRISTIANSON, 1985), e por competência celular a capacidade das células reagirem a sinais (que podem ser reguladores de crescimento) específicos de desenvolvimento (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999).

A embriogênese somática desempenha um papel importante na propagação clonal, quando integrado com programas de melhoramento genético convencional e molecular, a embriogênese somática fornece uma ferramenta valiosa

para o melhoramento genético de espécies de culturas comerciais (QUIROZ-FIGUEROA et al., 2006).

3.2.1 Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados para as plantas são determinados de acordo com as necessidades exigidas por estas, assim como pelos órgãos e resultados morfogênicos que se deseja obter. Basicamente, estes apresentam em sua composição macronutrientes, micronutrientes, suplementos de ferro, vitaminas, água, recursos para obtenção de carboidratos pelas plantas, myo-inositol e, quando necessário, reguladores de crescimento (DODDS; ROBERTS, 1995).

Os meios nutritivos ou de cultura são aqueles que fornecem todos os elementos inorgânicos essenciais para o crescimento e desenvolvimento *in vitro* a fim de suprir as necessidades metabólicas, estruturais e energéticas das células. As vitaminas possuem importantes funções catalisadoras em sistemas enzimáticos, sendo que as mais utilizadas são tiamina, ácido nicotínico e piridoxina (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998). De acordo com Torres et al. (2001) o inositol possui efeito no crescimento e desenvolvimento das plantas *in vitro*. Já Caldas et al. (1998) relatam que o inositol pode ser acrescido ou não aos meios de cultura e que o ágar e outros componentes também são necessários para os demais requerimentos das plantas e sustentação das mesmas no meio.

A composição e concentração de reguladores de crescimento vegetais no meio de cultura podem determinar o padrão de crescimento e desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultura de tecidos (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998). Ferri (1986) refere que existem cinco grupos de substâncias são consideradas como hormônios vegetais: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno e ácido abscísico e outros inibidores.

Do grupo das citocininas, nos protocolos que a utilizam em conjunto com as auxinas para a embriogênese somática, Raemakers et al. (1995) citam que a benzilaminopurina (BAP) é constantemente a mais empregada (57%), seguida pela cinetina (KIN) (37%), zeatina (3%) e thidiazuron (TDZ) (3%). Na grande maioria das vezes, a conjugação de auxinas com citocininas tem sido mais efetiva na indução da embriogênese do que somente as citocininas (MERKLE, 1995).

Já os fitoreguladores do grupo das auxinas são considerados como os mais importantes na regulação da embriogênese somática (COOKE; RACUSEN; COHEN, 1993; FEHÉR; PASTERNAK; DUDITS, 2003; GAJ, 2004). A sensibilidade aos fitoreguladores pode ser evidenciada pelo fato que somente tecidos responsivos reagem à presença das auxinas (BELL; TRIGIANO; CONGER, 1993; SOMLEVA et al., 1995). No entanto, diferenças nas respostas podem ocorrer dependendo da espécie, genótipo ou mesmo do tecido do mesmo explante ou em explantes de diferentes origens de uma mesma planta (DUDITS et al., 1995).

Raven et al. (1978), define os hormônios vegetais como substâncias orgânicas, ativas em pequenas quantidades, produzidas em um tecido e transportadas para outro, onde provocam respostas fisiológicas. Segundo Ferri (1986) os hormônios ou substâncias de crescimento são, portanto, obrigatoriamente produzidos por plantas e delas podem ser extraídos, já as substâncias reguladoras de crescimento, ou reguladores de crescimento, são substâncias sintéticas (sempre podem ser sintetizadas em laboratório) não produzidas por plantas, mas que produzem efeitos semelhantes aos produzidos pelos hormônios.

A auxina é indubitavelmente a principal classe de hormônio importante na diferenciação do floema e do xilema (THOMPSON; JACOBS 1966, ALONI, 1980; SACHS, 1984; WARREN; WARREN, 1984), regulando o crescimento e estimulando o alongamento das células dos tecidos jovens (DAVIES, 1995). A atividade das auxinas também está associada ao meristema cambial em plantas lenhosas, promovendo divisão celular, neste caso garantindo um processo de diferenciação e espessamento da parede normal (WAREING, 1958; BRUCK; PAOLILLO, 1984).

As auxinas 2,4-D e ANA (Ácido Naftaleno Acético) são sintéticas e têm efeitos semelhantes às auxinas de ocorrências naturais, sendo mais estáveis à degradação. Auxina sintética 2,4-D é um importante regulador de crescimento usado principalmente em embriogênese celular e sistema de cultura de tecidos e também envolvidos na indução de calos e estabelecimento da cultura de suspensão de células e estudos de cultura de tecidos de plantas (GASPAR et al., 1996; FEHER ; PASTERNAK; DUDITS, 2003), é bastante usada para a indução de calos e tem o efeito de supressão da morfogênese. O papel fundamental do 2,4-D para a indução de calos foi observado em diferentes monocotiledôneas (THOME et al., 1996; LENIS-MANZANO, 1998; LAMB et al., 2002; JIMENEZ, 2005; VASIL, 2005; CAMPOS et al., 2009). O crescimento celular é atribuído à rápida metabolização do

2,4-D, que leva ao espessamento das paredes celulares e à diferenciação irreversível em embriões somáticos (VASIL, 1988).

A auxina 2,4-D sozinha ou em combinação com outros reguladores de crescimento tem sido amplamente utilizada para a indução de embriogênese somática em gramíneas tais como *Saccharum officinarum* (HO; VASIL, 1983); *Zoysia spp.* (POEAIM; MATSUDA; MURATA, 2005); *Cenchrus ciliaries* (COLOMBA et al., 2006); *Chloris gayana* (GONDO et al., 2007); *Cynodon dactylon* (ZHANG; HANNA; OZIAS-AKINS 2007); *Zoysia matrella* (DHANDAPANI et al., 2008); *Eremochloa ofiuroides* (LIU et al., 2008; BARAMPURAM et al., 2009); *Pogonatherum paniceum* (WANG et al., 2008) e *U. brizantha* (CABRAL et al., 2011). Porém outras auxinas sintéticas, como o picloram, ainda não foram testadas para a regeneração de espécies de gramíneas tropicais do gênero *Urochloa*.

Outras auxinas tais como o 2,4,5-triclorofenoxiacéticos (2,4,5-T) e o picloram também tem sido utilizadas para a indução da formação de calos em espécies monocotiledôneas (AMMIRATO, 1993). O picloram é uma auxina sintética derivada do ácido picolínico e tem sido empregada em algumas espécies para a indução da embriogênese somática (DINESHKUMAR et al., 1995; GROLL et al., 2001; AKUTSU; SATO, 2002).

Em um estudo que comparou 2,4-D e picloram (2 mg/L) para indução de calos embriogênicos a partir de inflorescências de trigo, cevada e tritordeum (híbrido entre *Hordeum chilense* e *Triticum turgidum*) a embriogênese foi similar e em frequência superior em trigo e tritordeum do que em cevada, na qual a embriogênese foi obtida somente em meio suplementado com picloram. Além disso, a regeneração de calos embriogênicos induzidos em picloram foi aproximadamente duas vezes mais eficiente que culturas induzidas em 2,4 D (BARRO et al., 1999).

Dentre as palmáceas, há relatos de uso do picloram com sucesso no processo de embriogênese somática em *Phoenixcanariensis* e *Areca catechu* (HUONG et al., 1999; KARUN et al., 2004). A formação direta de embriões somáticos em *Paspalum scrobiculatum* ocorreu com a utilização de altos níveis de picloram, isoladamente ou em combinação com cinetina (KAUR; KOTHARI, 2004). O picloram também foi efetivo na obtenção de embriogênese somática repetitiva em *Arachis hypogaea* (LITTLE; MAGBANUA; PARROTT, 2000). A superioridade do picloram em relação ao 2,4-D e dicamba também foi também relatada por Steinmacher et al. (2007) em inflorescências de *Bactris gasipaes*. Por outro lado,

para *Feijoa sellowiana* o 2,4-D mostrou-se superior ao picloram na indução embriogênica (STEFANELLO *et al.*, 2005), assim como o capim *Deschampsia antartctica* as auxinas Dicamba e 2,4-D apresentaram maior percentual de calos embriogênicos do que o picloram (nas mesmas concentrações) (OSORIO *et al.*, 2014). Portanto, cada espécie vegetal responde de forma diferente as auxinas sintéticas utilizadas nos meios de cultura, dependendo da capacidade que cada espécie têm metaboliza-las.

3.3 Regeneração *in vitro* do gênero *Urochloa*

Em monocotiledôneas, especialmente nas espécies de gramíneas, a regeneração de plântulas tem sido obtida principalmente por meio de ou via embriogênese somática (VASIL; VASIL, 1982; VASIL, 2005). Evidências de mais de uma resposta morfogênica no mesmo explante sob o controle de diferentes concentrações e proporções de auxinas:citocininas foram observadas em espécies da família Poaceae como sorgo, painço, cana de açúcar e *Pogonatherum paniceum* (WANG *et al.*, 2008).

No entanto, para o gênero *Urochloa*, poucos trabalhos de regeneração via embriogênese somática estão disponíveis na literatura até o momento. A indução de embriogênese somática utilizando embriões de sementes maduras como fonte de explantes foi inicialmente proposta por alguns autores (THOME *et al.*, 1996; LENIS-MANZANO, 1998). De acordo com Lenis-Manzano *et al.* (2010) os embriões das sementes de *Urochloa brizantha* cv. Marandu são do tipo panicóide, não apresentando epiblasto, sendo que os embriões extraídos de sementes maduras constituem explante adequado para a regeneração *in vitro* e a formação de calos embriogênicos. Os embriões somáticos têm origem no escutelo estendendo-se para a periferia de embriões maduros.

Visando aumentar a eficiência da indução e regeneração de embriões somáticos em *U. brizantha*, Silveira *et al.* (2003) testaram a utilização dois meios de indução contendo 2 mg/L e 4 mg/L de 2,4-D, e obtiveram calos embriogênicos a partir de embrião isolado da semente em 73% dos explantes. Embora a frequência de indução ter sido alta, a rápida diferenciação dos calos friáveis em embriogênicos

foi acompanhada pela oxidação do escutelo resultando na paralisação do desenvolvimento.

De acordo com Cabral et al. (2011), a embriogênese somática em *U. brizantha* é influenciada por vários fatores, como o genótipo, tipo de explante e condições da cultura. Utilizando sementes maduras como explante os mesmos autores constataram baixa eficiência de regeneração, com o uso de 4 mg/L de 2,4-D e 0,2 mg/L de BAP, com um máximo de 21% e 17% de explantes apresentando multibrotações e embriogênese somática, respectivamente.

Recentemente um protocolo para indução de embriogênese somática utilizando meristemas apicais como fonte de explante foi relatado para a espécie diploide *U. ruziziensis* (ISHIGAKI et al., 2009). Sementes maduras também foram utilizadas como explantes, apesar de plantas terem sido regeneradas com sucesso, a eficiência foi baixa, obtendo plantas tetraplóides com um máximo de 28,6% e 31,3% de explantes apresentando multibrotações e embriogênese somática, respectivamente, com o uso de 4 mg/L de 2,4-D (ISHIGAKI et al., 2009). Posteriormente, esse mesmo protocolo foi utilizado para a transformação genética de *U. ruziziensis* via bombardeamento de partículas. Apesar da frequência de indução de calos embriogênicos ter sido baixa, esses autores foram bem sucedidos em multiplicar os calos durante oito meses antes do bombardeio com um vetor contendo os genes marcadores repórter *GUS* e de resistência ao herbicida fosfinotricina (*bar*) (ISHIGAKI et al., 2012). Calos embriogênicos foram o melhor alvo para a expressão transiente do gene *GUS*, mostrando significativamente maior número de pontos azuis por placa e por calo quando comparado aos brotos bombardeados. No entanto, apenas dois eventos transgênicos foram aclimatizados com sucesso e, apesar de ambas as plantas floresceram, eles não produziram sementes maduras (ISHIGAKI et al., 2012). Recentemente, foi demonstrado que estas plantas transgênicas eram tetraplóides, apesar do explante inicial utilizado para a transformação ser diplóide (ISHIGAKI et al., 2014). Estes autores também testaram regeneração de plantas em *U. ruziziensis* derivados de calos embriogênicos em diferentes idades (2, 4, 6 e 12 meses de idade) e eles demonstraram que quanto mais tempo os calos permanecerem em meios contendo 2,4-D maior o número de plantas poliplóides.

Apesar de alguns resultados positivos utilizando meristemas apicais como fonte de explante, culturas embriogênicas ou embriões continuam sendo os

alvos mais utilizados para a transformação genética de cereais e gramíneas forrageiras (HARWOOD, 2012). A utilização de explantes com elevada taxa de divisão celular é considerada um ponto chave para que a integração do DNA exógeno ocorra na transformação genética de monocotiledôneas (HIEI; KOMARI; KUBO, 1997; VASIL, 2005).

Até o momento somente os genótipos *U. brizantha* cv. Marandu e a *U. ruziziensis* cv. Kennedy foram testadas para a regeneração *in vitro* utilizando a auxina 2,4-D como indutor, outras auxinas tais como o picloram não foram testadas. Além disso, não se conhece o potencial embriogênico *in vitro* de outras cultivares de *U. brizantha* (Xaraés e Piatã) ou de outras espécies: *U. decumbens* (cv. Basilisk), *U. humidicola* (cv. Llanero) e *U. ruziziensis* (cv Ruziziensis).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Sementes maduras de espécies de *Urochloa* (Tabela 1) mantidas em câmara fria do laboratório a 15 ± 2 °C foram usadas para testar diferentes combinações de meios de cultura para indução de calos. As sementes foram escarificadas por imersão em ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado durante 15 minutos, agitando com um bastão de vidro, lavadas em água corrente para remover o excesso de ácido e, em seguida, as sementes foram secas sobre papel toalha à temperatura ambiente. Após secas, as sementes escarificadas foram descascadas manualmente e desinfestadas superficialmente por imersão em etanol 70% durante cinco minutos, seguido de um tratamento com hipoclorito de sódio (NaOCl) a 5%, contendo três gotas de Tween 80, durante 20 minutos, e, em seguida, enxaguadas cinco vezes em água destilada esterilizada.

Tabela 1: Procedência das sementes de *U. brizantha* (Marandu, Xaraés e Piatã), *U. decumbens* (Basilisk), *U. humidicola* (Llanero) e *U. ruziziensis* (Ruziziensis) utilizadas no experimento. SAFRA 2012/2013.

Espécie	Cultivares	% Germinação	Pureza	Procedência
<i>U. brizantha</i>	Marandu	81	92	Sementes Facholi ¹
<i>U. brizantha</i>	Piatã	85	98	Sementes Gasparim ²
<i>U. brizantha</i>	Xaraés	87	98	Sementes Gasparim
<i>U. decumbens</i>	Basilisk	84	91	Sementes Gasparim
<i>U. humidicola</i>	Llanero	87	98	Sementes Gasparim
<i>U. ruziziensis</i>	Ruziziensis	81	92	Sementes Facholi

¹ Empresa de Santo Anastácio – SP; ² Empresa de Presidente Bernardes - SP
Fonte: Do autor.

4.2 Meio de cultura e condições de cultivo

No primeiro experimento, sementes de *U. brizantha* (cv. Marandu) foram cultivadas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 30 g/L de sacarose, 300 mg/L de caseína hidrolisada, e diferentes concentrações de dois reguladores de crescimento de plantas: 2,4-D (2,4 Ácido Diclorofenoxiacético) e picloram (ácido 4-amino-3, 5,6 - ácido tricloropicolínico) nas concentrações: 1, 2, 4, e 8,0 mg/L. No segundo experimento, foram avaliados os efeitos do picloram, nas mesmas concentrações descritas acima, sobre os potenciais embriogênicos de outros genótipos de *U. brizantha* (cv. Piatã, Xaraés); *U. decumbens* (cv. Basilisk), *U. humidicola* (cv. Llanero) e *U. ruziziensis* (cv. Ruziziensis), utilizando também sementes maduras como explantes iniciais (6 cultivares x 1 regulador x 4 concentrações x 12 repetições).

Em todos os casos, os meios foram geilificados com 8 g/L de ágar e o pH foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ e os meios foram autoclavados a 121 ± 1 °C. Para cada tratamento, foram utilizados quatro placas de petri (10 cm) contendo 25 ml de cada um dos meios.

As sementes foram colocadas em cada placa de Petri com o embrião voltado para cima sem contato com o meio de cultura. As placas de Petri foram vedadas com filme plástico e mantidas no escuro, em câmara de crescimento, à temperatura de 25 ± 2 °C. Os explantes foram sub-cultivados a cada 14 dias nas mesmas condições e meio de cultura. A frequência de indução de calos primários foi avaliada aos 28 dias após a inoculação das sementes.

Para a regeneração de plantas, calos embriogênicos foram transferidos para o meio MS sem reguladores de crescimento por 14 dias sob condições de luz indireta ($1,7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), seguido da transferência para meio MS/2 (metade da concentração dos sais) suplementado com 2 mg/L de BA (Benziladenina) para regeneração de plantas, sob condições de luz direta ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e sob fotoperíodo de 16/8 h. A frequência de formação de brotos foi avaliada aos 14 dias após a transferência dos calos para o meio MS/2 contendo BA e o número total de plantas regeneradas aos 42 dias após esta transferência.

4.3 Análise citoquímica dos calos

Teste com Carmin acético foi realizado para confirmar a formação de células pró-embriogênicas em calos, 30 dias após cultivo em meio de indução. Amostras de calos (50 mg) foram depositadas sobre vidro relógio e coradas com duas gotas de corante azul de Evans (0,1% p/v) durante 3 min. O excesso de corante foi removido usando papel filtro e, em seguida, adicionou-se duas gotas de corante de carmin (2% p/v) mantendo o corante por 3 min. Após a remoção do excesso de corante, as amostras foram transferidas para lâminas, cobertas com lamínula e observadas em microscópio ótico. As fotografias foram realizadas em microscópio ótico (Moticam 580 Motic 5.0 mp) com aumento de 100x.

4.4 Enraizamento e aclimatização

Broto alongados foram isolados e transferidos para meio MS/2 para induzir o desenvolvimento radicular. Estes foram mantidos sob condição luz de 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Mudanças enraizadas foram removidas das placas de petri e as raízes foram lavadas em água corrente para remover o meio. As mudas foram transferidas para copos plásticos contendo substrato comercial (Bioplant[®]) e cobertos com outro copo plástico transparente com pequenos furos na parte superior para aclimação. Todas as plântulas permaneceram cobertas durante 2 semanas. A cobertura plástica foi progressivamente removida nas semanas seguintes de aclimatização.

4.5 Análise estatística

O experimento 1, o qual comparou diferentes concentrações das auxinas 2,4-D e picloram para a indução de embriogênese somática em *U. brizantha* cv. Marandu, foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), fatorial 1x2x4x12 (1 cultivar x 2 reguladores x 4 concentrações x 12 repetições).

Para o experimento 2, o qual comparou concentrações de picloram para a indução de embriogênese somática em diferentes genótipos de *Urochloa* o experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema

fatorial 6x1x4x12 (6 cultivares x 1 regulador x 4 concentrações x 12 repetições). Em ambos os experimentos para cada genótipo foram testadas quatro concentrações da auxina com quatro repetições. Cada repetição foi composta por uma placa contendo 10 sementes (totalizando 120 sementes por tratamento). A taxa de indução de calos foi calculada como a porcentagem de sementes com formação de calos primários.

A formação de brotos foi calculada como o número de calos primários que apresentaram diferenciação da parte aérea, independentemente do número de brotos formados por calo dividido pelo número de calos primários inoculados em placa de Petri e multiplicado por 100. A regeneração foi calculada contando o número total de plântulas formadas em cada tratamento.

Os dados em porcentagem foram transformados em arco seno $\sqrt{x/100}$ e submetidos à análise de variância (ANOVA) para detectar diferenças mínimas significativas entre as médias por meio do teste de Fisher (LSD) ($P < 0,05$) utilizando o software estatístico SISVAR, Versão 5.3 (FERREIRA, 2011).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise citoquímica dos diferentes tipos de calos de *Urochloa*

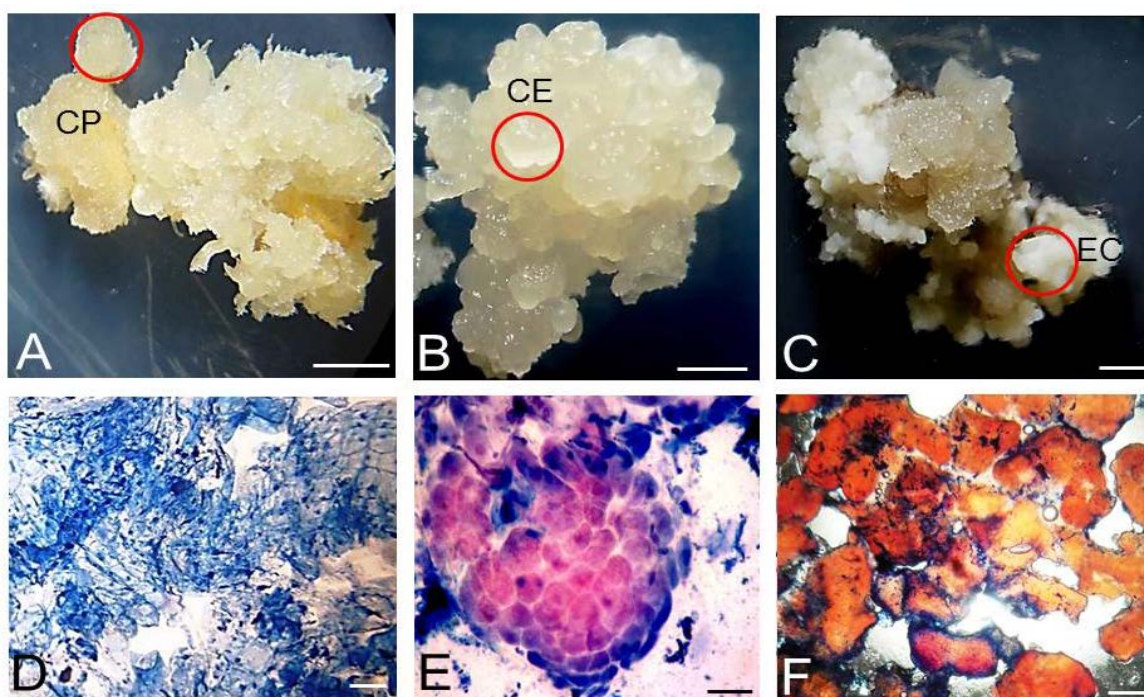
Assim como ocorre em outras espécies monocotiledoneas, tais como *Cynodon dactylon* (ZHANG; HANNA; OZIAS-AKINS, 2007) e *Pogonatherum paniceum* (WANG et al., 2008), diferentes tipos de calos, neste presente trabalho foram produzidos em *U. brizantha* cv. Marandu classificados de calos primários, calos embriogênicos e estruturas compactas. Estes diferentes tipos de calos foram utilizados para dupla coloração, com azul de Evans (0,1%) e o Carmim acético (2%) para confirmar a natureza embriogênica dos calos. A coloração azul indica a presença de células não embriogênicas (Figura 2A e D), enquanto que as estruturas que reagiram ao Carmim acético (estruturas avermelhadas) confirmaram a característica pró-embriogênica do material em estudo (Figura 2B e E). As estruturas compactas (Figura 2C e F), apesar da coloração vermelha, não foram capazes de regenerar plantas. Segundo Cabral *et al.* (2011) essas estruturas compactas são escutelos diferenciados dos embriões somáticos e produzem novos escutelos repetidamente. Este escutelo distinto envolve o eixo dos embriões somáticos, onde o coleótilo é uma bainha geralmente tubular em torno do meristema que contém um poro terminal.

Em estudos citoquímicos, o carmim acético e a reação Feulgen são utilizados para detectar glicoproteínas, cromatina e DNA, macromoléculas abundantes nas células embriogênicas. Células embriogênicas reagem fortemente ao corante Carmim acético (GUPTA; DURZAN, 1987). As células embrionárias e as células suspensoras apresentam-se agrupadas em agregados celulares presentes nas culturas embriogênicas durante a multiplicação e as células embrionárias estão associadas com a competência da célula para o desenvolvimento celular, as células suspensoras são alongadas, vacuoladas e sendo assim, permeáveis ao azul de Evans, apresentando desta forma coloração azul. (STEINER et al., 2005)

Além da diferença morfológica, esses calos diferem entre si pelo potencial de regeneração de plantas (NABORS et al., 1983). O calo denominado embriogênico apresenta a formação de pequenos embriões somáticos capazes de regenerarem plantas completas, com raiz e parte aérea, visto que os mesmos são bipolares. Enquanto que o calo não embriogênico é aquoso e sem consistência e

não apresenta a capacidade de regenerar plantas (NABORS et al., 1983; RASHID ; QURAISHI, 1989).

Figura 2: Análise citoquímica dos diferentes tipos de calos de *U. brizantha* cv. Marandu produzidos *in vitro*. (A) Calo Primário (CP), caracterizado como estrutura friável, não embriogênico; (B) Calo Embriogênico (CE), caracterizado como globulares e transparentes, (C) Estruturas Compactas (EC), formados a partir de calos primários, estrutura compacta. Teste usando Carmim acético para confirmar a formação de células embriogênicas, 30 dias após a inoculação no meio de indução. (D) calos não embriogênicos, (E e F) calos embriogênicos. Círculos vermelhos em A, B e C indicam o local de amostragem do calo. Barras: A, B e C = 25 mm; D, E e F = 100µM.



Fonte: Do autor.

Em monocotiledôneas, as referências mencionam a dificuldade em verificar os estádios de desenvolvimento embriogênico em cultura de tecidos, por meio de análise citoquímica obtivemos o sucesso em reconhecer essas estruturas, como pode ser observada na Figuras 2A-F.

5.2 Indução de calos embriogênicos e regeneração de plantas em *U. brizantha* cv. Marandu

Na primeira etapa desse trabalho foram testadas duas auxinas sintéticas (2,4-D e picloram) em diferentes concentrações (1, 2, 4, 8 mg/L) para a indução de embriogênese somática usando como explantes sementes maduras de *U. brizantha* cv Marandu. Quatro dias após a inoculação das sementes ocorreu o intumescimento do escutelo e a partir do sétimo dia após a inoculação das sementes, calos friáveis foram formados na superfície do escutelo. O número de sementes que produziram calos friáveis (primários) (Figura 3B) foi avaliado aos 28º dias após a inoculação (Tabela 2). A resposta morfogênica das sementes maduras em relação à indução de calos primários não apresentou diferença significativa entre os tratamentos propostos (Tabela 2).

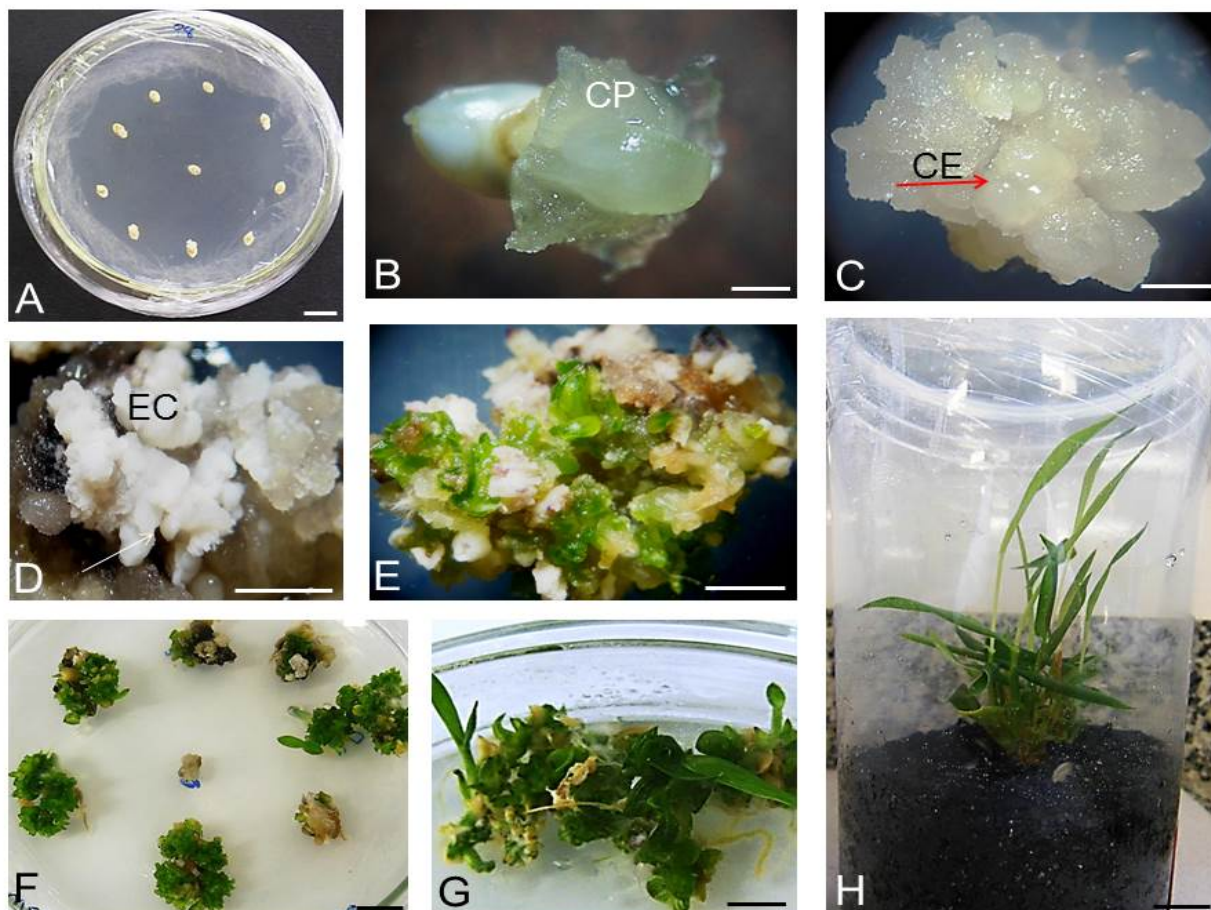
Tabela 2: Porcentagem de formação de calos, brotos e total de plantas regenerados, derivados de calos de sementes maduras de *U. brizantha* cv. Marandu usando diferentes concentrações de 2,4-D e picloram.

Auxina	Concentração (mg/L)	Explantes com calos primários (CP) (%)	Explantes com Estruturas Compactas (EC) (%)	Explantes com brotos (%)	Total de plantas regeneradas / tratamento
2,4-D	1	69,0 ± 3,94 a	40,0 ± 7,32 ab	36,4 ± 7,24 bc	41 ± 1,37
	2	69,2 ± 7,63 a	43,7 ± 7,27 ab	34,7 ± 7,20 c	46 ± 1,84
	4	68,6 ± 7,79 a	58,9 ± 7,07 a	37,2 ± 8,10 c	61 ± 2,60
	8	68,8 ± 7,49 a	59,2 ± 9,33 a	7,3 ± 2,94 d	3 ± 0,26
Picloram	1	68,1 ± 3,39 a	25,0 ± 5,02 b	60,4 ± 5,07 ab	97 ± 1,15
	2	69,2 ± 7,01 a	23,8 ± 6,02 b	53,5 ± 6,68 abc	48 ± 1,25
	4	68,0 ± 7,03 a	46,4 ± 5,56 ab	71,4 ± 7,86 a	74 ± 1,97
	8	58,5 ± 6,30 a	55,8 ± 8,68 a	59,4 ± 10,52 a	19 ± 1,05

Médias seguidas pela mesma letra minúsculas na coluna não diferem significativamente ($P < 0,05$) por teste de Fisher (LSD). * Médias ± erro da média.

Fonte: Do autor.

Figura 3: Etapas do desenvolvimento de calos embriogênicos e regeneração de plantas em *U. brizantha* cv. Marandu. A– Sementes maduras; B- CP: calos primários; C- CE: Calos Embriogênicos (seta vermelha). D- EC: Estruturas Compactas. E e F- Formação de brotos. G- Formação de plantas regeneradas. H-



Processo de aclimatização. Barras: A, F, G e H: 10 mm; B: 1 mm; C, D e E: 5 mm.

Fonte: Do autor.

Em *U. brizantha* o uso de sementes maduras intactas e embriões excisados das sementes promovem resultados similares na indução de calos embriogênicos sugerindo que a excisão dos embriões não é necessária (CABRAL et al., 2011). Sementes maduras foram também consideradas como os melhores explantes para indução de calos embriogênicos na monocotiledônea halófito *Leymus chinensis* (SUN; HONG, 2009).

De acordo com os autores citados acima, eles sugerem que concentrações mais elevadas de 2,4-D são necessárias para a indução de embriogênese somática usando esse tipo de explante. Mas como resultados,

tivemos que calos induzidos em altas concentrações de 2,4-D e picloram (8 mg/L), apresentaram aos 86 dias mudanças da coloração de tonalidade creme para marrom e depois para preto (oxidados) em 40% e 25% do total dos calos respectivamente (Figura 4B). Consequentemente, nessa concentração (8 mg/L) o menor número de plantas foi regenerado em ambos os reguladores de crescimento (Tabela 2). Além disso, os calos cultivados em 2,4-D apresentaram também maior quantidade de proliferação de raízes na concentração de 8 mg/L (Figura 4C).

Diferentes tipos de calos foram produzidos em *U. brizantha* cv. Marandu. Calos primários (CP), friáveis com coloração transparente, foram observados em todos os tratamentos independente do tipo e concentração do regulador de crescimento usado (Figura 3B). Estruturas globulares esbranquiçadas envolvidas por calos friáveis foram classificadas como calos embriogênicos (CE) (Figura 3C). A partir do calo friável surgiram em todos os tratamentos estruturas de coloração brancas opacas classificadas aqui, como estruturas compactas (EC) (Figura 3D).

As estruturas compactas (EC) ocorreram mais frequentemente na concentração mais alta de ambos os reguladores de crescimento (8 mg/L), 59,2% para o 2,4-D e 55,8% para picloram, respectivamente (Tabela 2). Entretanto, estas estruturas compactas não regeneram plantas, porém calos embriogênicos que surgem próximos a estas estruturas, regeneram plantas.

Após o período de indução dos calos embriogênicos em meio contendo auxinas (72 dias), os calos foram transferidos para meio sem regulador de crescimento e expostos diretamente a luz $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Esta transferência provocou o surgimento de pigmentação arroxeadada nos calos (Figura 4A). Essa coloração indica produção de antocianina podendo ser influenciada por diferentes fatores, tais como: luz ultravioleta (UV), luz, fonte de nitrogênio, tipo de açúcar, estresse osmótico, temperatura, etc (ZHANG et al., 1998). Esta pigmentação induzida por estresse também foi observadas por Cabral et al. (2011) em *U. brizantha* cv. Marandu. Quando os calos passaram por um período de 14 dias sob luz indireta ($1,7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), em meio MS sem regulador de crescimento, antes de serem transferidos diretamente para a luz, nenhum calo apresentou coloração arroxeadada, indicando que esse período sob luz indireta é essencial para evitar os estresses dos calos.

Quando os calos foram induzidos em altas concentrações de 2,4-D e picloram (8 mg/L), parte deles oxidaram com o passar do tempo e não regeneraram plantas. Segundo George e Sherington (1984) a oxidação ocorre em função da liberação de compostos fenólicos *in vitro*, precursores da síntese de lignina, pelo tecido injuriado ou senescente, que contém alta concentração desses componentes. Guerra *et al.* (1999) também relatam que estes compostos fenólicos são oxidados por polifenol oxidases, produzindo substâncias tóxicas, inibindo o crescimento dos explantes, além de escurecer o meio de cultura.

Figura 4: Diferentes modificações das estruturas dos calos produzidos em meio MS contendo 8 mg/L de 2,4-D. A- Calo com pigmentação arroxeada. B- Calo oxidado. C- Calo com formação de raízes. Barra: 5 mm.



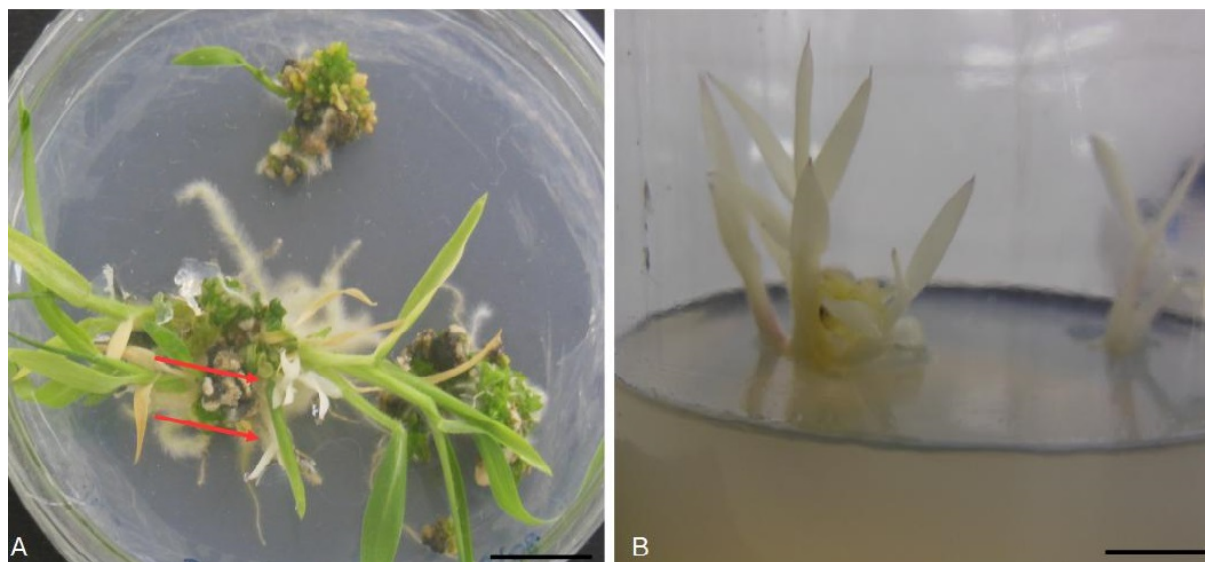
Fonte: Do autor.

Nas concentrações mais altas de picloram (4 mg/L e 8 mg/L) pode-se observar um fato interessante para a cultura de tecidos, ausência de plantas albinas, o que não ocorreu na presença de 2,4D (Figura 5A e B). O albinismo é caracterizado por uma perda parcial ou completa de pigmentos de clorofila e da diferenciação incompleta de membranas de cloroplasto. Por sua vez, prejudica a fotossíntese e as plantas acabam por morrer numa fase jovem sem atingir a maturidade. Condições ambientais, tais como condições de luz, temperatura, composição do meio de cultura desempenham papel na determinação da frequência de formação de plantas albinas (KUMARI *et al.*, 2009).

Segundo Cabral *et al.* (2011) a *U. brizantha* demonstrou ser sensível à exposição a longo prazo ao 2,4-D em meio de cultura, sendo possivelmente o

responsável pela alta frequência de albinismo observada em culturas de calos embriogênicos cultivados durante quatro meses na presença dessa auxina (CABRAL et al., 2011). Esses autores sugerem que é preferível usar o meio com menor quantidade da auxina 2,4-D para evitar a obtenção de plantas albinas, pois a embriogênese somática repetitiva em *U. brizantha* é altamente predisposta ao albinismo, podendo impossibilitar uma cultura a longo prazo para esta espécie.

Figura 5: A- Plantas albinas regeneradas em 8 mg/L de 2,4-D (setas vermelhas); B- Plantas albinas. Barra: 10 mm.



Fonte: próprio autor

No presente trabalho nenhuma planta albina foi encontrada quando cultivadas com picloram mesmo em altas doses (8 mg/L). Este resultado está de acordo com o encontrado por Sharma et al. (2005) os quais verificaram que a utilização de picloram para indução de embriogênese somática em trigo não gerou de plantas de albinas mesmo a longo prazo.

O albinismo é comum em culturas de tecidos em algumas plantas monocotiledóneas, tais como cevada (ZIAUDDIN; KASHA, 1990; BREGITZER; CAMPBELL, 2001; SHARMA et al., 2005), festuca (BAI; QU, 2000) e junco (CUI et al., 2000). O albinismo pode ser um preditor de perda de potencial embriogênico e altos níveis de variação somaclonal após longos períodos em meio de cultura (ZIAUDDIN; KASHA, 1990). Em *Cynodon dactylon* o albinismo parece ser genótipo-dependente, sendo que a regeneração de brotos albinos foi um dos principais

problemas da cultivar TifSport, mas não foi encontrado em outros cultivares tais como TifEagle ou Tift93-132 (ZHANG; HANNA; OZIAS-AKINS, 2007).

A conversão em plantas é a fase final do processo de embriogênese somática. Após a maturação os embriões normalmente são transferidos para meio de cultura com baixa concentração de auxinas ou desprovidos desses reguladores podendo ser acrescentado citocininas ou GA₃ ao meio de cultura, para conversão dos embriões em plântulas (AHLOOWALIA; MARETZKI, 1983). Em particular, a presença de auxina promove a proliferação de calos e inibe a diferenciação enquanto que a remoção ou diminuição da auxina permite desenvolvimento dos embriões somáticos. A remoção da auxina parece fornecer o sinal para as células dos calos ingressarem em um padrão organizado de crescimento. Sugere-se que, na presença de auxina, as massas pro-embriogênicas (PEM) já estão preparadas para completar o estágio globular da embriogênese, porém as PEMs podem conter produtos inibitórios para o progresso do programa de embriogênese. Consequentemente, a remoção de auxina pode resultar na inativação dos genes responsáveis pela presença de estes produtos inibitórios, permitindo que a embriogênese progrida (ZIMMERMAN, 1993).

Neste trabalho, para a conversão em plantas os calos de *Urochloa* foram transferidos para meio MS/2 contendo 2 mg/L de BA. As placas contendo os calos embriogênicos foram mantidas em luz direta (30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) até o surgimento de brotos. Embora ambas as auxinas (2,4-D e picloram) induziram calos embriogênicos em *U. brizantha* cv. Marandu, o picloram independente da concentração produziu maior número de calos com brotos e de plantas regeneradas (Tabela 2).

Picloram também foi eficiente para indução de calos embriogênicos em várias espécies usando diferentes concentrações: 12 mg/L em mandioca (GROLL et al., 2001), 6 mg/L tulipa (PTAK; BACH, 2007), 2,4 mg/L em pupunheira (STEINMACHER et al., 2007), 2,4 mg/L em bocaiuva (MOURA et al., 2009) e 60 mg/L dendezeiro (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2010). Há diversos relatos mostrando superioridade do picloram em relação ao 2,4-D na indução da embriogênese somática como por exemplo em *Arachis hypogaea* (LITTLE; MAGBANUA; PARROTT, 2000); *Cicer arietinum* (DINESHKUMAR et al., 1995) e em *Freesia hybrida*, onde o picloram induziu de três a doze vezes mais embriões somáticos do que o 2,4-D (BACH, 1992). Na monocotiledônea ornamental

Alstroemeria cv. Fuego, o picloram na concentração de 2 mg/L demonstrou a maior formação de calos embriogênicos compactos do que a mesma concentração de 2,4-D (KHALEGHI et al., 2008).

Do ponto de vista do potencial de multiplicação e custos envolvidos, a embriogênese somática apresenta uma enorme vantagem sobre os outros sistemas de micropropagação. Grandes quantidades de embriões podem se formar em suspensões de células embriogênicas com um mínimo de manipulação manual e espaço físico de laboratório, principais componentes do custo de uma planta micropropagada (STYER, 1985).

Desta forma, ao final, o picloram (Figura 3H) independente da concentração, resultou um número maior de plantas regeneradas em relação ao 2,4D.

5.3 Regeneração *in vitro* em outros genótipos de *Urochloa* usando picloram

O primeiro experimento deste trabalho comparou concentração das auxinas 2,4-D e picloram para a indução de embriogênese somática em *U. brizantha* cv Marandu. O número de calos com brotos e o número de plantas regeneradas usando a auxina picloram foram significativamente superiores aos obtidos usando o 2,4-D (Tabela 2). Sendo assim, decidiu-se testar as mesmas concentrações de picloram (1, 2, 4, 8 mg/L) para avaliar a capacidade embriogênica das cultivares de Xaraés e Piatã de *U. brizantha* e para outras espécies do gênero tais como *U. decumbens* (Basilisk), *U. humidicola* (Llanero) e *U. ruziziensis* (Ruziziensis), usando sementes maduras como explante.

No presente estudo os diferentes genótipos de *Urochloa* testados, diferiram na sua capacidade embriogênica e de regenerar plantas. As cultivares Piatã e Xaraés de *U. brizantha* apresentaram as maiores porcentagens de formação de calos primários diferindo estatisticamente das demais. Houve interação significativa apenas entre a cultivar Piatã e as concentrações mais baixas de picloram (1 e 2 mg/L) (Tabela 3). Os resultados corroboram com os do experimento

da primeira etapa picloram 1mg/L para indução de calos embriogênicos e regeneração de plantas em *U. brizantha*.

Tabela 3: Porcentagem da formação de calos primários derivados de sementes maduras de *U. brizantha* (Marandu, Xaraés e Piatã), *U. decumbens* (Basilisk), *U. humidicola* (Llanero) e *U. ruziziensis* (Ruziziensis) usando diferentes concentrações de picloram.

CULTIVAR	1	2	4	8
	(mg/L de picloram)			
Marandu	68,1 ± 3,39 bcA	69,2 ± 7,01 bA	68,0 ± 7,03 bcA	58,5 ± 6,30 cdA
Piatã	84,80 ± 3,40 aAB	90,89 ± 3,12 aA	80,62 ± 2,54 abB	78,72 ± 3,47 abB
Xaraés	75,06 ± 4,94 abA	85,64 ± 3,16 aA	84,39 ± 3,04 aA	79,08 ± 4,34 aA
Basilisk	66,55 ± 5,62 bcA	64,17 ± 4,17 bA	56,66 ± 6,55 cA	61,04 ± 5,14 bcA
Llanero	47,5 ± 4,10 cdA	50,00 ± 3,02 bcA	54,17 ± 4,17 cdA	58,33 ± 4,58 cdA
Ruziziensis	40,83 ± 2,87 dA	34,17 ± 3,58 cA	36,67 ± 3,33 dA	37,5 ± 2,79 dA

Médias seguidas pela mesma letra minúsculas na coluna e maiúsculas na linha não diferem significativamente ($P < 0,05$) por teste de Fisher (LSD). * Médias ± erro da média.

Fonte: Do autor.

Em relação ao número de calos com formação de brotos, a cultivar Marandu apresentou o maior percentual independente da concentração de picloram utilizada e foi significativamente diferente dos demais genótipos testados (Tabela 4). Já em relação à interação entre as cultivares e concentrações de picloram, a cultivar Piatã foi a única que apresentou interação significativa com as concentrações de 4mg/L. Porém mesmo nessa concentração o percentual médio de formação de brotos foi inferior a qualquer das concentrações de picloram para a cultivar Marandu, indicando que esta cultivar é a mais responsiva, *in vitro*, para as condições utilizadas neste trabalho. A cultivar Marandu não apresentou diferença significativa entre as concentrações, portanto em relação custo benefício a utilização de 1 mg/L é o mais viável.

Tabela 4: Porcentagem da formação de brotos derivados de calos primários de *U. brizantha* (Marandu, Xaraés e Piatã), *U. decumbens* (Basilisk), *U. humidicola* (Llanero) e *U. ruziziensis* (Ruziziensis) usando diferentes concentrações de picloram.

CULTIVAR	1	2	4	8
	(mg/L de picloram)			
Marandu	60,4 ± 5,07 aA	53,5 ± 6,68 aA	71,4 ± 7,86 aA	59,4 ± 10,52 aA
Piatã	9,31 ± 3,50 bB	6,97 ± 2,33 bB	31,78 ± 6,04 bA	7,65 ± 2,41 bB
Xaraés	6,67 ± 2,13 bA	16,85 ± 5,84 bA	11,52 ± 2,29 bcA	6,32 ± 1,99 bA
Basilisk	14,37 ± 4,58 bA	8,71 ± 2,62 bA	10,33 ± 3,96 cA	8,37 ± 5,53 bA
Llanero	12,96 ± 8,20 bA	2,15 ± 1,62 bA	7,86 ± 3,23 cA	2,10 ± 1,63 bA
Ruziziensis	6,38 ± 4,28 bA	6,34 ± 3,65 bA	4,82 ± 4,11 cA	0,71 ± 0,06 bA

Médias seguidas pela mesma letra minúsculas na coluna e maiúsculas na linha não diferem significativamente (P <0,05) por teste de Fisher (LSD). * Médias ± erro da média.

Fonte: Do autor.

Em relação ao número total de plantas regeneradas nos diferentes tratamentos houve interação significativa somente entre os genótipos *U. decumbens* cv. Basilisk, *U. brizantha* cv. Marandu e Xaraés e as concentrações de picloram. O maior número de plantas regeneradas foi observado na concentração de 1 mg/L de picloram para esses três genótipos e não houve diferença significativa entre eles (Tabela 5). Apesar do número de calos com brotos para a *U. decumbens* cv. Basilisk ter sido relativamente baixo para a concentração de 1 mg/L, apenas 14,37% (Tabela 4), este tratamento regenerou o maior números de plantas (108) (Tabela 5). Isto pode ter ocorrido, pois, foi avaliado somente o percentual de calos que apresentavam brotos e não o número de brotos por calo.

Além das condições de cultivo, também devem ser considerados como fundamentais, o explante inicial, incluindo o seu genótipo, o estágio de desenvolvimento e as condições fisiológicas, como por exemplo, o conteúdo hormonal endógeno do material, demonstrando que a embriogênese pode ser definida como um processo multifatorial e altamente complexo (FLOH; SANTA-CATARINA; SILVEIRA, 2007).

Tabela 5: Total de plantas regeneradas a partir de calos primários derivados de sementes maduras de *U. brizantha* (Marandu, Xaraés e Piatã), *U. decumbens* (Basilisk), *U. humidicola* (Llanero) e *U. ruziziensis* (Ruziziensis) usando diferentes concentrações de picloram.

CULTIVAR	1	2	4	8
	(mg/L de picloram)			
Marandu	97 ± 1,15 aA	48 ± 1,25 aAB	74 ± 1,97 aA	19 ± 1,05 aB
Piatã	38 ± 1,92 bcA	32 ± 2,00 aA	69 ± 2,08 aA	22 ± 0,90 aA
Xaraés	76 ± 2,69 abA	25 ± 1,44 aAB	26 ± 1,40 abAB	2 ± 0,17 aB
Basilisk	108 ± 3,23 aA	45 ± 1,67 aB	37 ± 2,38 abB	6 ± 0,26 aB
Llanero	3 ± 0,25 cA	2 ± 0,17 aA	0 ± 0 bA	0 ± 0 aA
Ruziziensis	13 ± 1,08 cA	22 ± 1,33 aA	8 ± 0,67 bA	5 ± 0,42 aA

Médias seguidas pela mesma letra minúsculas na coluna e maiúsculas na linha não diferem significativamente ($P < 0,05$) por teste de Fisher (LSD). * Médias ± erro da média.

Fonte: Do autor.

No presente estudo, os diferentes genótipos de *Urochloa* testados, diferiram na sua capacidade embriogênica e de regeneração de plantas. As plantas regeneradas foram aclimatizadas com sucesso, sendo plantas fenotipicamente normais. A habilidade para indução de calos embriogênicos é influenciada pelo genótipo, assim como sua resposta morfogênica e a habilidade de regenerar plantas, indicando que estes critérios são genótipo-dependentes (LIMA et al., 2001; CIDADE et al., 2006; LAKSHMANAN, 2006). De acordo com Gandonou et al. (2005), por ser a capacidade embriogênica uma característica estável desde a primeira geração, seria possível prognosticar essa capacidade em uma determinada linhagem por avaliar a taxa embriogênica de seus ancestrais.

As condições para promover a embriogênese somática estão relacionadas com a presença de reguladores de crescimento, estresses osmóticos, alterações de pH, choques térmicos e tratamentos com diferentes substâncias, sendo as auxinas referenciadas como essenciais na indução do processo (FLOCH; SANTA-CATARINA; SILVEIRA, 2007). Desta forma, as auxinas são uma das mais importantes classes de reguladores de crescimento, uma vez que são substâncias

chave de vários aspectos do crescimento e desenvolvimento das plantas (PIERUZZI et al., 2011).

Neste trabalho sementes maduras de *U. humidicola* cv. Llanero apresentaram recalcitrância *in vitro* para as condições testadas. Em outros trabalhos com gramíneas a recalcitrância de determinados genótipos também foi observada. Algumas cultivares do capim apomítico *Pennisetum ciliare* foram recalcitrantes *in vitro* quando embriões maduros foram utilizados como explante inicial (COLOMBA et al., 2006). Todavia, quando anteras dessas mesmas cultivares foram utilizadas como explantes iniciais a indução de calos embriogênicos foi observada em até 44% dos explantes e posteriormente regeneraram plantas normais (CARLONI et al., 2014) utilizando as mesmas condições descritas por Colomba et al. (2006) com exceção da origem do explante. Assim outros explantes tais como antera ou inflorescências poderão ser testados para a indução de embriogênese somática em *U. humidicola* cv. Llanero visto que a utilização de sementes maduras para essa espécie não apresentou resultados satisfatórios para a regeneração de plantas.

A capacidade de induzir embriões somáticos está sob controle genético, de forma que genótipos de uma determinada espécie podem diferir no seu potencial embriogênico (MAY; TRIGIANO, 1991; VAN DER VALK; PEDERSON; DAVIS, 1992; BERED et al., 1996; SUN et al., 2003; LAMB et al., 2002). Portanto o potencial embriogênico deve ser testado para cada genótipo que se pretende trabalhar, variando tipos e concentrações de reguladores de crescimento.

A tecnologia da micropropagação é útil por si mesma, e pode ser extremamente valiosa na propagação de genótipos superiores, desde que os protocolos permitam alta frequência de regeneração de plantas. A tecnologia *in vitro* é uma poderosa ferramenta com vantagens qualitativas, precedendo a incorporação das plantas regeneradas em um programa convencional de melhoramento (CROCOMO; CABRAL, 1985).

Os resultados demonstraram que a cultivar Basilisk obteve a melhor performance de regeneração de plantas em 1mg/L de picloram, sendo esta concentração idêntico ao encontrado para a cultivar Marandu do primeiro experimento. Dando destaque, que estas duas cultivares citadas, serem as mais cultivadas em pastos no Brasil e este é o primeiro trabalho a utilizar este indutor na embriogênese somática. Portanto, é recomendado para a embriogênese somática a concentração de 1 mg/L de picloram.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A auxina picloram demonstrou ser superior ao 2,4-D para regeneração *in vitro* de plantas de *U. brizantha* cv Marandu via embriogênese somática.

A concentração de 1 mg/L de picloram produziu o maior número de plantas regeneradas nos genótipos *U. decumbens* cv. Basilisk e *U. brizantha* cv. Marandu e Xaraés.

Plantas fenotipicamente normais foram regeneradas, sendo aclimatizadas com sucesso para todos os tratamentos realizados.

Este é o primeiro trabalho a usar o picloram para a indução de embriogênese somática em diferentes genótipos do capim braquiária usando sementes maduras como explante inicial.

Esse protocolo poderá ser utilizado em experimentos de transformação genética para introdução de características desejadas nesse gênero.

REFERÊNCIAS

- AHLOOWALIA, B. S.; MARETZKI, A. Plant regeneration via somatic embryogenesis in sugarcane. **Plant Cell Rep.**, n. 2, p.21–25, 1983.
- AKUTSU, M.; SATO, H. Induction of proembryos in liquid culture increases the efficiency of plant regeneration from *Alstromeria* calli. **Plant Science.**, n. 163, p.475-479, 2002.
- ALMEIDA, H. S. et al. Cotyledon integrity *Anadenanthera colubrina* (VELL.) BRENNAN (FABACEAE-MIMOSOIDEAE) germination and early establishment. **Cerne**, Lavras, v. 16, n. 2, p. 227-234, 2010.
- ALONI, R. Role of auxin and sucrose in the differentiation of sieve and tracheary elements in plant tissue cultures. **Planta**, v.150, p.255-263, 1980.
- ALVES, S. J.; FILHO, C. V. S. Espécies forrageiras recomendadas para o Paraná. In: **Forragicultura do Paraná**. Londrina: Iapar, 1996. p.181-195.
- ALVES, E. R.; CARNEIRO, V. T. C.; ARAÚJO, A. C. G. Direct evidence of pseudogamy in apomictic *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Sexual Plant Reproduction**, v.14, 2001.
- AMMIRATO, P. G. V. Embryogenesis. In: EVANS, D. A. et al. **Handbook of plant cell culture**. New York: MacMilan Publisher Company, 1993. v.1.
- ARAÚJO, S. A. C.; DEMINICS, B. B.; CAMPOS, P. R. S. S. Melhoramento genético de plantas forrageiras tropicais no Brasil. **Archivos de Zootecnia**, v.57, 2008.
- ARAÚJO, A. C. G. et al. Female gametophyte development in apomictic and sexual *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Révue de Cytologie et de Biologie Végétales - Le Botaniste**, v.23, 2000.
- BACH, A. Somatic embryogenesis from zygotic embryos and meristems of *Freesia hybrida*. **Acta Hortic.** n.325, p.429–433.1992.
- BAI, Y.; R. QU. An evaluation of callus induction and plant regeneration in twenty-five turf-type tall fescue (*Festuca arundinace* Schreb) cultivars. **Grass Forage Sci.** n. 55, p. 326-330, 2000.
- BARAMPURAM, S. et al. Development of an embryogenic callus induction method for centipede grass (*Eremochloa ophiuroides* Munor) and subsequent plant regeneration. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.**, n. 45, p.155–161. 2009.
- BARDUCCI, R. S. et al. Produção de *Brachiaria brizantha* e *Panicum maximum* com milho e adubação nitrogenada. **Archivos de Zootecnia**, v.58, n.222, 2009.

BARRO, F. et al. Medium optimization for efficient somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescences and immature sealella of elite cultivars of wheat, barley and tritordeum. **Euphytica**, n.108, p. 161-167. 1999.

BELL, L. M.; TRIGIANO, R. N.; CONGER, B. V. Relationship of abscisic acid to somatic embryogenesis in *Dactylis glomerata*. **Environmental Experimental Botany**, v.33, 1993.

BERED, F. et al. Avaliação de embriogênese somática em cultivares de aveia (*Avena sativa* L.). **Clínica Rural**, Santa Maria, v.26, n.3, p.371-375, 1996.

BREGITZER, P.; CAMPBELL, R. D. Genetic markers associated with green and albino plant regeneration from embryogenic barley callus. **Crop Sci.**, n. 41, p.173-179. 2001.

BRUCK, D. K.; PAOLILLO, D. J. Jr. Anatomy of nodes vs. internodes in *Coleus*: The longitudinal course of xylem differentiation. **Am J Bot.**, v.71, p.151-157, 1984.

CABRAL, G. B. et al. Ocorrência de albinismo em embriogênese somática repetitiva em *Brachiaria brizantha*. Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2006. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado técnico, 155).

CABRAL, G.B. et al. Somatic embryogenesis and organogenesis in apomitic and sexual *Brachiaria brizantha*. **Plant Cell Tiss Organ Cult.**, n. 107, p. 271-282, 2011.

CALDAS, L. S. et al. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa/CNPH, 1998. v. 1.

CAMPOS, J. M. S. et al. Embriogênese somática em híbridos de *Pennisetum sp.* e avaliação de estabilidade genômica por citometria. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.38-44, 2009.

CARLONI, E. et al. Somatic embryogenesis from in vitro anther culture of apomitic buffel grass genotypes and analysis of regenerated plantas using flow cytometry. **Plant Cell Tiss Organ Cult.**, n.117, p.311-322, 2014.

CARNAHAN, H. L.; HILL, H. D. Apomixis in the Gramineae: *Panicoideae*. **American Journal of Botany**, n. 54, p. 253-253, 1958.

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, 2002.

CASTRO, L. M. et al. Embriogênese somática a partir de calos de cultivares de laranja doce. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.8, aug. 2010.

CIDADE, D. A. P. et al. Morfogênese in vitro de variedades brasileiras de cana-de-açúcar. Rio de Janeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n.41, p. 385-391, 2006.

COLOMBA, E.L. et al. The effect of genotype and culture medium on somatic embryogenesis and plant regeneration from mature embryos of fourteen apomictic cultivars of buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L.). **Grass Forage Sci.**, n. 6, p.2-8, 2006.

CHRISTIANSON, M. L. An embryogenic culture of soybean: towards a general theory of somatic embryogenesis. In: HENKE, R. R. et al. (Ed.). **Tissue culture in forestry and agriculture**. New York: Plenum, 1985. p. 83-103.

CHU, C. C. et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in callus from inflorescences of *Hordeum vulgare* x *Triticum aestivum* hybrids. **Theoretical and Applied Genetics**, v.68, p.375-379, 1984.

COOKE, T. J.; RACUSEN, R. H.; COHEN, J. D. The role of auxin in plant embryogenesis. **Plant Cell**, v. 5, 1993.

CROCOMO, O.J.; CABRAL, J. B. Interspecific hibridization in *Phaseolus*: embryo axis culture. In: COCOMO, O. J. et al. **Biotechnology of plants and microorganisms**. Columbus: Ohaio State Univ. Press, 1995. p. 95- 96.

CUI, Y. Y. et al. Number of air exchanges, sucrose concentration, photosynthetic photon flux, and differences in photoperiod and dark period temperatures affect growth of *Rehmannia glutinosa* plantlets in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.62, n.3, p.219-226, 2000.

DEO, P. C. et al. Factors affecting somatic embryogenesis and transformation in modern plant breeding. **The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences**, v.28, p.27-40, 2010.

DHANDAPANI, M. et al. Regeneration of zoysia grasss (*Zoysia matrella* L. Merr.) cv. Konhee from young inflorescences and stem nodes. **In vitro Cell Dev Biol Plant.**, n. 44, p.8-13, 2008.

DINESHKUMAR, V. et al. Picloram induced somatic embryogenesis in chickpea (*Cicer arietinum* L.) **Plant Science.**, n.109, p. 207-213, 1995.

DUDITS, D. et al. Molecular biology of somatic embryogenesis. In: THORPE, T. A. (ed.). **In Vitro Embryogenesis in Plants**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995.

DURZAN, D. J. Somatic polyembryogenesis for the multiplication of tree crops. **Biotechnology Genetics Engineering Review**, v.6, 1988.

DUSI, D. M. A. et al. Estudo da polinização e fecundação no gênero *Brachiaria*. In: CARNEIRO, V. T. C.; DUSI, D. M. A. (Ed.). **Clonagem de plantas por sementes: estratégias de estudo da apomixia**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004.

EMBRAPA GADO DE CORTE. **BRS Piatã: *Brachiaria brizantha*: qualidade: tecnologia: resistência: produtividade**. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2008.

EUCLIDES, V.P.B. et al. Produção de forragem e características da estrutura do dossel de cultivares de *Brachiaria brizantha* sob pastejo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.1805-1812, 2008.

EUCLIDES, V. P. B. et al. Valor nutritivo da forragem e produção animal em pastagens de *Brachiaria brizantha*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.98-106, 2009.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, and Tissue Organ Culture**, v.74, 2003.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.35, n.6, p.1039-1042, nov./dez. 2011.

FERRI, M. G. Fisiologia vegetal 1. 2. ed. São Paulo: EPU, 1986.

FLOH, E. I. S.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V. Marcadores bioquímicos e moleculares para estudos da morfogênese *in vitro*. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. n. 13, p. 1992-2001, 2007.

GAJ, M. D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulator**, v.43, 2004.

GANDONOU, C. et al. Effect of genotype on callus induction and plant regeneration from leaf explants of sugarcane (*Saccharum sp.*). **African Journal of Biotechnology**, n. 4, p. 1250-1255, 2005.

GASPAR, T. et al. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. **In Vitro Cell Development Biology-Plant**, Columbia, v. 32, p. 272-289, oct./dec. 1996.

GEORGE, E. F.; SHERINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture – Handbook and Directory of Commercial Laboratories**. [s.l.]: Eastern Press, 1984.

GONDO, T. et al. Somatic embryogenesis and multiple-shoot formation from seed-derived shoot apical meristems of rhodesgrass (*Chloris gayana* Kunth). **Grassl Sci.** n. 53, p.138–42, 2007.

GRAY, D. J. Nonzygotic embryogenesis. In: TRIGIANO, R.N.; GRAY, D.J. (Eds.). **Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises**. New York: CRC Press, 1996. p.133-147.

GROLL, J. et al. Secondary somatic embryogenesis of cassava on picloram supplemented media. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 65, p. 201-210, 2001.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura**

de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1999. v. 2, p. 533-568.

GUPTA, P. K.; DURZAN, D. J. Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in lobolly pine. **Biotechnology**, v.5, p.147-151, 1987.

HANNA, W. W.; BASHAW, E. C. Apomixis: its identification and use in plant breeding. **Crop Science**, Madison. v. 27, n. 6, 1987.

HARWOOD, W.A. Advances and remaining challenges in the transformation of barley and wheat. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.63, n.5, 2012.

HIEI, Y.; KOMARI, T.; KUBO, T. Transformation of Rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant molecular Biology**. Heidelberg, v.35, n.1, 1997.

HO, W.; VASIL, K. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.): The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. **Protoplasma journal**. n.118, p. 169-180. 1983.

HUONG, L.T. et al. Somatic embryogenesis in Canary Island date palm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. n.56:, p.1-7, 1999.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Sistema IBGE de recuperação automática**: efetivos dos rebanhos. 2013. Disponível em: <<http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias?view=noticia&id=1&busca=1&idnoticia=221>>. Acesso em: 04 abril 2013.

ISHIGAKI, G. et al. Multiple shoot formation, somatic embryogenesis and plant regeneration from seed-derived shoot apical meristems in ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*). **Grassland Science**, Tokyo, v.55, n.3, 2009.

ISHIGAKI, G. et al. Fertile transgenic *Brachiaria ruziziensis* (ruzigrass) plants by particle bombardment of tetraploidized callus. **Journal of Plant Physiology**, 2012.

ISHIGAKI, G. et al. Spontaneous appearance of polyploids in plantlets regenerated from embryogenic calli derived from seedling-meristems of ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis* Germain et Everard.). **Grassland Science**. n.60, p. 24-30. 2014.

JAKELAITIS, A. et al. Efeito de herbicidas no consorcio de milho com *Brachiaria brizantha*. **Planta Daninha**, v.23, p.69-78, 2005.

JAKELAITIS, A. et al. Cultivares de milho e de gramíneas forrageiras sob monocultivo e consorciação. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.40, p.380-387, 2010.

JIMENEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, v.47, p.91-110, 2005.

JIMENEZ, V. M. Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, n.2, p.196-223, 2001.

KARUN, A. et al. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf and inflorescence explants of arecanut (*Areca catechu* L.) **Current Science**, n.86, p.1623-1628, 2004.

KARIA, C.T.; DUARTE, J.B.; ARAÚJO, A.C.G. Desenvolvimento de cultivares do gênero *Brachiaria* (trin.) Griseb. no Brasil. Planaltina: **Embrapa Cerrados**, 2006. 57p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 163).

KAUR, P.; KOTHARI, S. L. *In vitro* culture of kodo millet: influence of 2,4-D and picloram in combination with kinetin on callus initiation and regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.77, 2004.

KELLER-GREIN, G.; MAASS, B.L.; HANSON, J. Natural variation in *Brachiaria* and existing germoplasma collection. In: MILES, J. W.; MAASS, B.L.; VALLE, C.B., (Ed.) **Brachiaria: biology, agronomy, and improvement**. Cali: CIAT/ Brasília: EMBRAPA-CNPQC, p.16-42, 1996.

KHALEGHI, A. et al. In vitro propagation of *Alstroemeria* cv. Fuego. **American Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Science**. n.3, p.492-497, 2008.

KOLTUNOW, A. M.; BICKNELL, R. A.; CHAUDHURY, A. M. Apomixis: molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 108, 1995.

KRIKORIAN, A. D.; BERQUAM, D. L. Plant cell and tissue culture: the role of Haberlandt. **Botanical Review**, v.35, p. 59-88, 1969.

KUMARI, M. et al. Albinism in plants: a major bottleneck in wide Hybridization, androgenesis and doubled haploid culture. **Crit. Rev. Plant Sci**. n.28, p.393-409, 2009.

LAKSHMANAN, P. Somatic embryogenesis in sugarcane. **In Vitro Celular & Developmental Biology – Plant**, n.42, p. 201-205, 2006.

LAMB, C. R. C. et al. Embriogênese somática e regeneração de plantas a partir de embrião maduro de aveia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.123-130, 2002.

LENIS-MANZANO, S. J. **Desenvolvimento de um método de transformação genética de *Brachiaria spp*, por bombardeamento de partículas**. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília. 131 p. 1998.

LENIS-MANZANO, S. J. et al. Histologia da embriogênese somática induzida em embriões de sementes maduras de *Urochloa brizantha* apomítica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 5, 2010.

LIMA, M. A. C. et al. Morfogênese *in vitro* e susceptibilidade de calos de variedades nacionais de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) a agentes seletivos utilizados em sistemas de transformação genética. **Revista Brasileira de Botânica**, n. 24, p. 73-77, 2001.

LITTLE, E. L.; MAGBANUA, Z. V.; PARROTT, W. A. A protocol for repetitive somatic embryogenesis from mature peanut epicotyls. **Plant Cell Reports**, v.19, 2000.

LIU, M. et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in centipedegrass (*Eremochloa ophiuroides* [Munro] Hack.). **The Society for In Vitro Biology**, 2008.

MACEDO, M. C. M. Integração lavoura e pecuária: o estado da arte e inovações tecnológicas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.133-146 (Supl. Esp.), 2009.

MACHADO, L. A. Z.; ASSIS, P. G. G. Produção de palha e forragem por espécies anuais e perenes em sucessão à soja. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.45, n.4, p.415-422, 2010.

MAY, R. A.; TRIGIANO, R. N. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Dendranthema grandiflora*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.116, n.2, p.366-371, 1991.

MEDEIROS, L. T. **Pastagem de *Brachiaria Brizantha* fertirrigada com dejetos líquidos de suínos**. 97 p. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade José do Rosário Vellano, Unifenas- MG.

MEIRELLES, P. R.; MOCHIUTTI, S. Formação de pastagens com Capim Marandu (*Brachiaria brizantha* cv Marandu) nos cerrados do Amapá. **Boletim de Recomendação Técnica**. Embrapa Amapá. Nov./99. 7: p.1-3. 1999.

MERKLE, S. A. Strategies for dealing with limitations of somatic embryogenesis in hardwood trees. **Plant Tissue Culture Biotechnology**, v.1, 1995.

MILACHI, S. C. K. et al. Regeneração de plantas no cultivo de calos de genótipos brasileiros de trigo (*Triticum aestivum* L.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 11-12, p. 1947-1956, 1991.

MILES, J. W.; MAASS, B.L.; VALLE, C.B. ***Brachiaria*: biology, agronomy and improvement**. Cali: CIAT, 1996.

MONTANARI, R. et al. Correlación de la productividad de un forraje con las propiedades físicas de un Ultisol en Aquidauana. **Revista Ceres**, v.60, p.102-110, 2013.

MOREIRA, H. J. C.; BRAGANÇA, H. B. N. **Manual de identificação de plantas infestantes: cultivos de verão**. Campinas: [s.n.], 2010. 642p.

MOURA, E. F. et al. Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos. **Scientia Horticulturae**, v.119, p. 447–454, 2009.

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

NABORS, M. W. et al. DEMon: long-duration, high-frequency plant regeneration from cereal tissue cultures. **Planta**, n.157, p.385-391, 1983.

NAMASIVAYAM, P. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 86, p. 285-301, 2007.

NUNES, S. G. et al. **Brachiaria brizantha cv. Marandu**. Campo Grande: EMBRAPA-CNPQC, 1984. (Documento, 21)

OSORIO, J. et al. The effects of growth regulators and a scanning electron microscope study of somatic embryogenesis in Antarctic hair grass (*Deschampsia antarctica* Desv.). **Polar Biol.**, n.37, p.217-225, 2014.

OZIAS-AKINS, P. Apomixis: developmental characteristics and genetics. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.25, 2006.

PENTEADO, M. I. O. et al. **Determinação de ploidia e quantidade de DNA em diferentes espécies do gênero *Brachiaria***. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2000. (Embrapa Gado de Corte. Boletim de pesquisa, 11)

PEREIRA, R. G. et al. Influencia dos sistemas de manejo do solo sobre os componentes de produção do milho e *Brachiaria decumbens*. **Revista Caatinga**, Mossoro, v. 22, n. 1, p. 64-71, 2009.

PIERUZZI, F. P. et al. Polyamines, IAA and ABA during germination in two recalcitrant seeds: *Araucaria angustifolia* (Gymnosperm) and *Ocotea odorifera* (Angiosperm). **Annals of Botany**, n. 108, p. 337-345, 2011.

POEAIM, A.; MATSUDA, Y.; MURATA, T. Plant regeneration from immature inflorescence of *Zoysiagrass* (*Zoysia spp*). **Plant Biotechnol.**, n. 22, p.245–248, 2005.

PTAK, A.; BACH, A. Somatic embryogenesis in tulip (*Tulipa gesneriana* L.) flower stem cultures. **In Vitro Cell Dev Biol Plant.**, n.43, p.35–39, 2007.

QUIROZ-FIGUEROA, F. R. et al. M.Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 86, p. 285-301, 2006.

RAEMAKERS, C. J. J. M.; JACOESEN, E.; VISSER, R. G. F. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. **Euphytica**, n.81, p.93-107, 1995.

RASHID, H.; QURASHI, A. High frequency embryogenic callus induction and its regeneration in three wheat cultivars. In: A. Mujeeb, Qazi, and L. A. Stich (eds.). Review of Advances in Plant Biotechnology. **CIMMYT and IRRI**, n.1985-88, p. 205-214, 1989.

RAVEN, P. H.; EVER T, R. F.; CURTIS, H. **Biologia vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1978. 724 p.

RENVOIZE, S. A.; CLAYTON, W. D.; KABUYE, C. H. S. Morphology, taxonomy, and natural distribution of *Brachiaria* (Ed.) Griseb. In: MILES, J.W.; MAASS, B.L.; VALLE, C.B. **Brachiaria: biology, agronomy, and improvement**. Cali: CIAT, 1996. p.1-15.

RESENDE, F. D. et al. Estratégias de suplementação na recria e terminação de bovinos de corte. Efeitos do nível de suplementação na recria sobre o desempenho na terminação. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 45., 2008, Lavras. **Anais...**Lavras: UFLA, 2008.

SACHS, T. Axiality and polarity in vascular plants. In: BARLOW, P. W.; CARR, D. J. (Eds.) **Positional controls in plant development**. Cambridge: Cambridge University Press, 1984. p.193-224.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. **In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, v. 46, p.378-385, 2010.

SERRÃO, E. A. D.; SIMÃO NETO, M. **Informações sobre duas espécies de gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria* na Amazônia: *B. decumbens* Stapf e *B. ruziziensis* Germain et Evrard**. Belém: Instituto de Pesquisa e Experimentação Agropecuária do Norte, 1971. (IPEAN. Série: Estudos sobre forrageiras na Amazônia, v.2., n.1)

SHARMA, V. K. et al. Seasonal effect on tissue culture response and plant regeneration frequency from non-bombarded immature scutella of barley (*Hordeum vulgare*) harvested from controlled environment. **Plant Cell Tissue Culture**, Dordrecht, v. 81, p. 19-26, 2005.

SILVEIRA, E.D. et al. Evaluation of exogenous promoters for use in *Brachiaria brizantha* transformation. **Journal of Plant Biotechnology**, v.5, p.87-93, 2003.

SIMIONI, C.; VALLE, C. B. Chromosome duplication in *Brachiaria* (A. rich.) Stapf allows intraspecific crosses. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**., n.9, p.328-334, 2009.

SOMLEVA, M. M. et al. Anticytokinin effects on in vitro response of embryogenic and nonembryogenic genotypes of *Dactylis glomerata* L. **Plant Growth Regulator**, v.16, 1995.

STEFANELLO, S. et al. Somatic embryogenesis from floral tissues of feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg). **SciHortic.**, n.105, p. 117–126, 2005.

STEINER, C. F. et al. Temporal stability of aquatic food webs: partitioning the effects of species diversity, species composition and enrichment. **Ecol. Lett.**, v.8, p. 819–828, 2005.

STEINMACHER, D. A. et al. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. **In Vitro Cellular and Developmental Biology–Plant**, v. 43, p. 124-132, 2007.

STYER, D.J. Bioreactor technology for plant propagation. **Basic Life Science**, v. 32, p. 117-130, 1985.

SUN, Y. et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in wild cotton (*Gossypium klotzschianum*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 75, n. 3, p. 247-253, dec. 2003.

SUN, Y. L.; HONG, S. K. Somatic embryogenesis and in vitro plant regeneration from various explants of the halophyte *Leymus chinensis* (Trin.). **Journal of Plant Biotechnology**, 36, n.3, p. 236-243, 2009.

SWEBY, D. L.; HUCKETT, B. I.; WATT, M. P. Effects of nitrogen nutrition on salt-stressed *Nicotiana tabacum* var. Samsun in vitro plantlets. **Journal of Experimental Botany**, n.45, p. 995-1008, 1994.

THOME, J. et al. Applications of biotechnology to *Brachiaria*. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. (Eds.) **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Cali-Colombia: CIAT; Campo Grande-Brasil: Embrapa, 1996.

THOMPSON, N. P.; JACOBS, W. P. Polarity of IAA effect on sieve-tube and xylem regeneration in *Coleus* and tomato stems. **Plant Physiology**, n. 41, p.673-682, 1966.

THORPE, T. A.; HARRY, I. S.; KUMAR, P. P. Application of micropropagation to forestry, 1984. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation-Technology and Application**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1991. p.310-312.

TORRES, A. C. et al. **Meio e condições de incubação para culturas de tecidos de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI. (Embrapa-SPI. Circular Técnica, 24). 20p. 2001.

TORRES, J. L. R.; PEREIRA, M. G.; FABIAN, A. J. Produção de fitomassa por plantas de cobertura e mineralização de seus resíduos em plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 421-428, 2008.

TUCKER, M.R.; KOLTUNOW, A.M.G. Sexual and asexual (apomictic) seed development in flowering plants: molecular, morphological and evolutionary relationships. **Functional Plant Biology**, v. 36, 2009.

VALLE, C. B.; GLIENKE, C. New sexual accessions in *Brachiaria*. **Apo. Newslet**, v. 3, 1991.

VALLE, C. B.; GLIENKE, C.; LEGUIZAMON, G. O. C. Inheritance of apomixis in *Brachiaria*, a tropical forage grass. **Apomixis Newsletter**, v. 7, 1994.

VALLE, C. B.; SAVIDAN, Y. H. Genetics, cytogenetics and reproductive biology of *Brachiaria*. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. (Eds). **Brachiaria: biology, Agronomy, and improvement**. Cali: CIAT; Brasília: EMBRAPA-CNPQC, 1996.

VALLE, C. B. et al. Apomixia e sua utilização no melhoramento de *Brachiaria*. In: CARNEIRO, V. T. C.; DUSI, D. M.A. (Ed.). **Clonagem de plantas por sementes: estratégias de estudo da apomixia**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004.

VALLE, C. B. et al. Melhoramento genético de *Brachiaria*. In: RESENDE, R.M.S.; VALLE, C.B.; JANK, L. (Eds.) **Melhoramento de forrageiras tropicais**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2008. p.13-53.

VAN DER VALK, A.; PEDERSON, R.L.; DAVIS, C.B. Restoration and creation of freshwater wetlands using seed banks. **Wetl Ecol Manage**, v. 1, n. 4, p.191–197, 1992.

VASIL, V.; VASIL, I. K. Characterization of an embryogenic cell suspension culture derived from cultured inflorescences of *Pennisetum americanum* (Pearl Millet, Gramineae). **American Journal of Botany**, v. 69, p. 1441-1449, 1982.

VASIL, I. K. Progress in the regeneration and genetic manipulation of cereal crops. **Bio/Technology**, v. 6, p. 397-402, 1988.

VASIL, I. K. The story of transgenic cereals: the challenge, the debate, and the solution: a historical perspective. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 41, p. 577-583, 2005.

VICIENT, C. M.; MARTINEZ, F. X. The potential uses of somatic embryogenesis in agroforestry are not limited to synthetic seed technology. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, n. 10, v. 1, p. 1-12, 1998.

WANG, W. et al. Simple hormonal regulation of somatic embryogenesis and/or shoot organogenesis in caryopsiscultures of *Pogonatherum paniceum* (Poaceae). **Plant Cell**, v. 95, p. 57-67, 2008.

WAREING, P. F. Interaction between indole-acetic acid and gibberellic acid in cambial activity. **Nature**, n. 181, p. 1744-1745, 1958.

WARREN, W. J.; WARREN, W. P. M. Control of tissue patterns in normal development and in regeneration. In: Barlow, P. M.; Carr, D. J. (Eds.). **Positional controls in plant development**. Cambridge: Cambridge University Press, 1984. p.225-280.

WILLIAMS, E. G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. **Ann. Bot.**, n. 57, p. 443-462, 1986.

ZHANG, Y. et al. A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. **Nat Genet.**, n. 20, p. 123–128, 1998.

ZHANG, S.; HANNA, W.; OZIAS-AKINS, P. Comparison of callus induction and plant regeneration from different explants in triploid and tetraploid turf-type bermuda grasses. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, n. 70, p. 71–78, 2007.

ZIAUDDIN, A.; KASHA, K. J. Long-term callus cultures of diploid barley (*Hordeum vulgare*). I. Auxin effects on culture initiation and maintenance. **Euphytica**, n. 48, p. 171-176, 1990.

ZIMMERMAN, J. L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **The Plant Cell**, n. 5, p. 1411-1423, 1993.