

## Introdução in vitro, micropropagação e conservação de plantas de *Brachiaria sp*

Gláucia Barbosa Cabral<sup>1</sup>  
Marcela Versiani Venâncio Pires<sup>2</sup>  
Ana Luiza Lacerda<sup>2</sup>  
Vera Tavares de Campos Carneiro<sup>1</sup>

### INTRODUÇÃO

*Brachiaria* é um gênero de forrageiras proveniente da África, e introduzido no Brasil em 1952 (Serrão & Simão Neto, 1971). Estas gramíneas ocupam atualmente, em torno de 40 milhões de hectares, principalmente nas regiões de cerrado, devido à sua excelente adaptabilidade a solos pobres (Miles et al., 1996). Esta área de pastagens é ocupada principalmente por duas espécies de *Brachiaria*, *B. brizantha* e *B. decumbens*, ambas com modo de reprodução apomítico (Valle et al., 1994). A apomixia é um modo de reprodução assexual por sementes que gera plantas idênticas à planta-mãe (Nogler, 1984). Existindo, portanto, apenas dois clones de plantas de duas espécies desta gramínea, *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria brizantha*, ocupando a extensa área de pastagens do País.

Atualmente há grande interesse em desenvolver técnicas de biotecnologia com *Brachiaria* para aumentar a variabilidade genética, contribuir com o melhoramento e estudar genes relacionados à apomixia (Carneiro & Dusi, 2002). Estas técnicas envolvem desde a regeneração in vitro e transformação de plantas até análises genômicas. A micropropagação ou propagação vegetativa de plantas in

vitro, constitui um modo de se manter sempre disponível explantes saudáveis e livres de contaminação para aplicação de técnicas de regeneração por cultura de tecidos e transformação genética, além de ser altamente conveniente para manutenção de coleções de plantas de genótipos diferentes, livres de patógenos.

Para o sucesso de métodos de micropropagação in vitro é necessária: a seleção dos explantes adequados, estabelecendo-se condições de desinfestação e cultura; o estabelecimento das condições físicas e fisiológicas de desenvolvimento dos explantes e o enraizamento das partes aéreas formadas após subcultivos sucessivos formando a planta completa (Grattapaglia & Machado, 1990).

Neste trabalho foram estabelecidos meios de cultura para a micropropagação de explantes de *Brachiaria*. Os explantes foram multiplicados por multibrotação de nós de plantas mantidas em campo. As plantas estão mantidas in vitro na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia há três anos através de subcultivos mensais de meristemas basais no meio de manutenção de plantas (MMP).

<sup>1</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Caixa Postal 02372, 70849-970 Brasília-DF  
E-mail: gbcabral@cenargen.embrapa.br

<sup>2</sup> Universidade de Brasília Campus universitário Darcy Ribeiro CEP 70.910-900

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material Vegetal

Foram utilizadas plantas de *B. brizantha* apomítica (BRA 000591) e sexual (BRA 002747), e *B. decumbens* apomítica (BRA 000191) e sexual (BRA 00430), introduzidas por mudas fornecidas pela Embrapa Gado de Corte e mantidas a campo em canteiros irrigados na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

### Introdução e micropropagação das plantas in vitro

Colmos das plantas de *Brachiaria* foram coletados, cortados os nós e retiradas as folhas, expondo as gemas axilares nos nós. Para desinfestação superficial dos nós foi usada imersão em álcool 70% por 3 minutos, em hipoclorito de sódio 5% ou 7,5% por 30 ou 20 minutos, respectivamente, e em seguida, foram realizadas três enxágües com água esterilizada.

Os nós foram inoculados em meio LS (Linsmaier & Skoog 1965) suplementado com cinetina (3mg/L ou 6mg/L) para induzir multibrotação.

### Manutenção e micropropagação in vitro

Brotos isolados das multibrotações foram transferidos para o meio B (Bourgin et al, 1979) modificado, contendo sacarose 30g/L (Pinheiro et al., 2000) em tubos de ensaio, para formação de planta inteira.

Meristemas basais, de plantas cultivadas in vitro, foram excisados e inoculados em meio de manutenção de plantas (MMP) ou inoculados em placas de Petri, contendo meio LS (Pinheiro et al., 2000) para micropropagação in vitro.

**Tabela 1:** Meios de cultura utilizados para micropropagação e manutenção das plantas de braquiária in vitro

Meios de Cultura Componentes	LS	MMP	B modificado
Sais	MS	MS (0,5 [Macro])	MS
Vitaminas	-	MS	Morel
Caseína hidrolisada	100 mg/L	100 mg/L	-
Inositol	100 mg/L	-	-
Tiamina	100 mg/L	-	-
ANA	1 mg/L	0,2 mg/L	-
Cinetina	3 mg/L	0,5 mg/L	-
GA <sub>3</sub>	-	0,2 mg/L	-
BAP	3 mg/L	-	-
Sacarose	30 g	20 g	30 g
Agar	7 g/L	7 g/L	7 g/L

pH 5,8

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

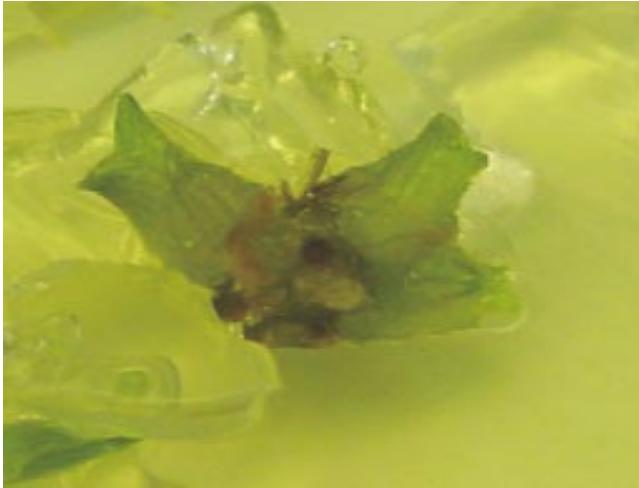
Inicialmente os nós obtidos de plantas do campo foram inoculados intactos no meio LS após a desinfestação, ocorrendo uma perda de quase 100% do material introduzido devido a contaminações por fungos e/ou bactérias endógenas. A utilização do fungicida Benlate no meio de cultura reduziu a contaminação por fungo, mas propiciou um aumento da contaminação por bactérias. Retirando-se parte do tecido vascular dos nós, deixando somente a porção que contém a gema, a contaminação foi bastante reduzida, principalmente por fungos, dispensando a adição do fungicida. Foi testado também o isolamento da gema, mas esta não resistiu ao processo da desinfestação. Nas condições testadas as gemas não apresentaram capacidade para o desenvolvimento e plantas só se desenvolveram quando estavam ligadas ao tecido do nó. A desinfestação com hipoclorito de sódio 5% por 20 minutos, após a retirada do excesso de tecido vascular do nó, propiciou a introdução in vitro de explantes sem danificá-los demasiadamente.

O corte dos nós das plantas dos acessos de *Brachiaria decumbens*, apresentando colmos mais finos foi dificultado, ocasionando uma perda em torno de 97% das gemas introduzidas, mesmo na presença de antibiótico Cefotaxima 250 mg/L.

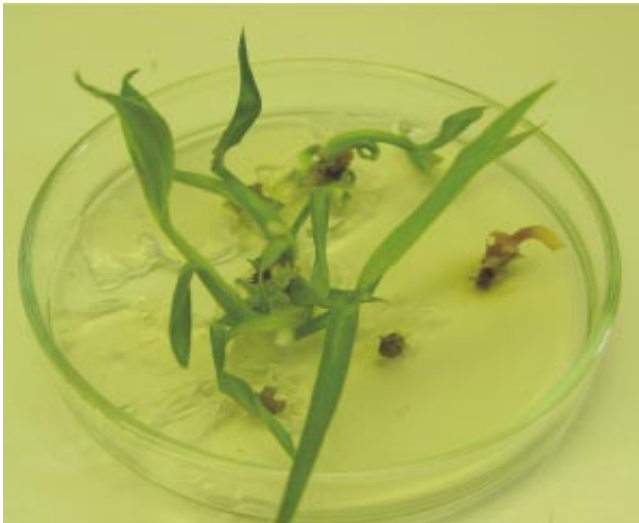
No meio de cultura LS, ocorreu o desenvolvimento de um ou dois brotos por gema (Figura 1) introduzida de *B. brizantha*, tanto apomítica como sexual, indicando que o balanço hormonal não foi suficiente para induzir a multibrotação. Duplicando a concentração de cinetina no meio LS, foram observados múltiplos brotos em 2 semanas de cultivo (Figura 2). No acesso apomítico e no sexual de *B. decumbens* houve multibrotação no meio LS contendo a concentração original de cinetina (3 mg/L), indicando que estes genótipos são mais responsivos à esta substância. No entanto, quando os explantes destes acessos foram submetidos ao dobro da concentração deste regulador de crescimento não houve multibrotação, provavelmente devido ao efeito deletério causado pela concentração elevada.

Brotos foram individualizados e transferidos para meio B, propiciando o desenvolvimento de plantas inteiras. Após sucessivos subcultivos foi observado que as plantas estavam ficando amareladas e não formavam raízes (Figura 3). Assim, o meristema basal de cada planta foi transferido para meio MMP. Neste meio as plantas se mantiveram vigorosas por períodos mais longos, e foi observada maior formação de raízes, indicando que para ambas espécies é necessária a suplementação com reguladores de crescimento para a manutenção in vitro das plantas por longo prazo (Figura 4).

Plantas de *B. brizantha* e *B. decumbens* vêm sendo micropropagadas e mantidas in vitro em laboratório em meio MMP há 3 anos, sem que tenha sido detectado qualquer alteração fenotípica, servindo como fonte de explantes para experimentos de regeneração e transformação genética de braquiária conduzidos em nosso laboratório.



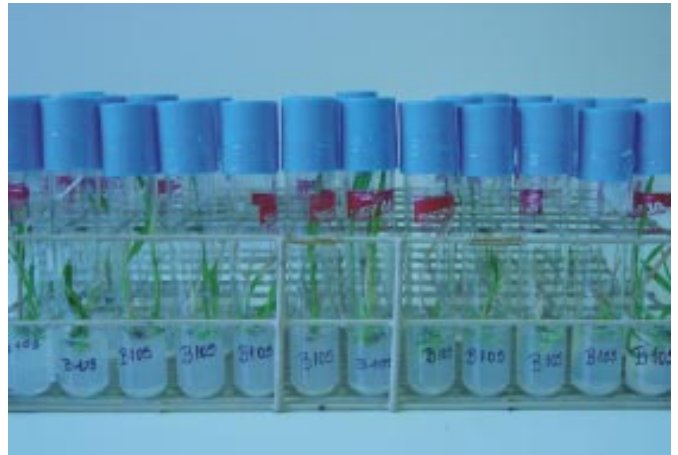
**Fig. 1.** Gemas *B. brizantha* apomítica induzidas em meio LS com concentração de cinetina de 6mg/L.



**Fig. 2.** Multibrotação em gema do acesso apomítico de *B brizantha* em meio LS com 6mg/L de cinetina.



**Fig. 3.** Plantas do acesso sexual de *B brizantha* em meio B após vários subcultivos



**Fig. 4.** Plantas do acesso sexual de *B brizantha* mantidas em meio MMP.

## Referências Bibliográficas

- BOURGIN, J. P.; CHUPEAU, Y.; MISSONIER, C. Plant Regeneration from Mesophyll Protoplasts of Several *Nicotiana* species. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 45, p. 188-292, 1979.
- CARNEIRO, V. T. C.; DUSI, D. M. A. Apomixia: em busca de tecnologias de clonagem de plantas por sementes. **Biociência**, Brasília, v. 25, p. 36-42, 2002.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação: 170. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPQ / ABCTP, 1990. p. 99.
- LINSMAIER, E. M.; SKOOG, J. L. Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 18, p. 100-127, 1965.
- MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. do. KUMBLE, V. (Ed.). **Brachiaria: biology, agronomy, and improvement**. Cali: CIAT/Campo Grande: EMBRAPA-CNPQC, 1996. 288p. (CIAT. Publication, 259).
- NOGLER, G. A. Gametophytic Apomixis. In: JOHRI, B. M. (Ed.). **Embryology of Angiosperms**. Berlin: Springer-Verlag, 1984. p. 475-518.
- PINHEIRO, A. A.; POZZOBON, M. T.; VALLE C. B.; PENTEADO, M. I. O.; CARNEIRO, V. T. C. Duplication of the chromosome number of diploid *Brachiaria brizantha* plants using colchicine. **Plant Cell Reports**, New York, v. 19, p. 274-278, 2000.

SERRÃO, E. A.; SIMÃO NETO, M. **Informações sobre duas espécies de gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria* na Amazonia: *B. decumbens* Stapf e *B. ruziensis* Germain et Everard.** Belém: Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Norte, 1971. 31p. (IPEAN. Serie Estudos Sobre Forrageiras na Amazonia, v. 2, 1) .

VALLE, C. B. ; GLIENKE, C. ; LEGUIZAMON, G. O. C. Inheritance of apomixis in *Brachiaria*, a tropical forage grass. **Apomixis Newsletter**, n. 7, p. 42-43, 1994.

### Comunicado Técnico, 101

Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**  
Serviço de Atendimento ao Cidadão  
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) -  
Brasília, DF. CEP 70.770-900 - Caixa Postal 02372  
PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624  
<http://www.cenargen.embrapa.br>  
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2003): 150 unidades

### Comitê de publicações

**Presidente:** *José Manuel Cabral de Sousa Dias*  
**Secretário-Executivo:** *Maria José de Oliveira Duarte*  
**Membros:** *Maurício Machaim Franco*

*Regina Maria Dechechi G. Carneiro*

*Luciano Lourenço Nass*

*Sueli Correa Marques de Mello*

*Vera Tavares Campos Carneiro*

**Supervisor editorial:** *Maria José de Oliveira Duarte*

**Normalização Bibliográfica:** *Maria Alice Bianchi*

**Editoração eletrônica:** *Giscard Matos de Queiroz*

### Expediente