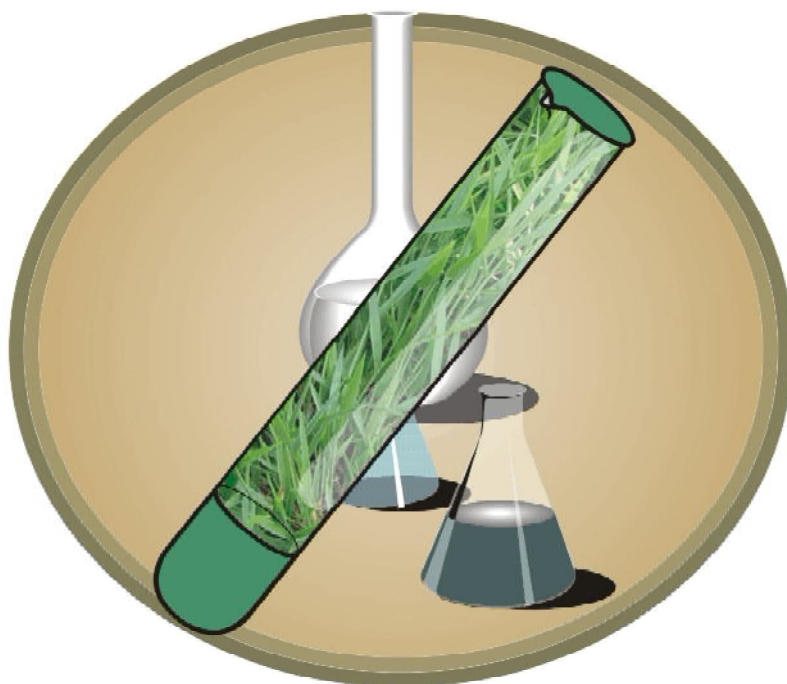


**Protocolos para Assepsia  
de Meristemas e Cultura de  
Tecidos para o Gênero  
*Brachiaria* (Trin.) Griseb e  
Melhor Tratamento para  
Duplicação de Número  
Cromossômico**





ISSN 1983-974X

Novembro, 2007

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Gado de Corte  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

## **Documentos 169**

# **Protocolos para Assepsia de Meristemas e Cultura de Tecidos para o Gênero *Brachiaria* (Trin.) Griseb e Melhor Tratamento para Duplicação de Número Cromossômico**

*Carine Simioni  
Cacilda Borges do Valle*

Embrapa Gado de Corte  
Campo Grande, MS  
2007

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Gado de Corte**

Rodovia BR 262, Km 4, CEP 79002-970 Campo Grande, MS

Caixa Postal 154

Fone: (67) 3368 2083

Fax: (67) 3368 2180

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

E-mail: [publicacoes@cnpgc.embrapa.br](mailto:publicacoes@cnpgc.embrapa.br)

**Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: *Cleber Oliveira Soares*

Secretário-Executivo: *Wilson Werner Koller*

Membros: *Antonio do Nascimento Rosa, Ecila Carolina Nunes Zampieri Lima, Geraldo Augusto de Melo Filho, Gracia Maria Soares Rosinha, Lúcia Gatto, Manuel Antônio Chagas Jacinto, Maria Antonia Martins de Ulhôa Cintra, Tênisson Waldow de Souza, Wilson Werner Koller*

Supervisão editorial: *Ecila Carolina Nunes Zampieri Lima*

Revisão de texto: *Lúcia Helena Paula do Canto*

Normalização bibliográfica: *Elane de Souza Salles*

Editoração eletrônica e Tratamento de ilustrações: *Ecila Carolina N. Z. Lima*

**1ª edição**

1ª impressão (2007): 500 exemplares

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

**Embrapa Gado de Corte.**

---

Simioni, Carine.

Protocolos para assepsia de meristemas e cultura de tecidos para o gênero *Brachiaria* (Trin.) Griseb e melhor tratamento para duplicação de número cromossômico / Carine Simioni, Cacilda Borges do Valle. -- Campo Grande, MS : Embrapa Gado de Corte, 2007.

25 p. ; 21 cm. -- (Documentos / Embrapa Gado de Corte, ISSN 1983-974X ; 169).

1. Pastagem. 2. Melhoramento genético vegetal. 3. Gramínea forrageira. 4. *Brachiaria* (Trin.) Griseb. 5. Poliploidia. I. Valle, Cacilda Borges do. II. Título. III. Série.

CDD 633.2 (21.ed.)

---

© Embrapa Gado de Corte 2007

## **Autores**

**Carine Simioni**

Bióloga, D.Sc., c.simi@ig.com.br

**Cacilda Borges do Valle**

Engenheira Agrônoma, Ph.D. em Genética e Melhoro-  
ramento Vegetal, pesquisadora da Embrapa Gado de  
Corte, Campo Grande, MS,  
cacilda@cnpqg.embrapa.br



## Sumário

<b>Resumo</b> .....	<b>7</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>9</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>10</b>
<b>Materiais</b> .....	<b>11</b>
<b>Metodologia</b> .....	<b>12</b>
Cultivo de meristemas <i>in vitro</i> .....	12
Preparo de soluções-estoque .....	12
Esterilização de materiais de uso rotineiro .....	14
Preparo de meio LS para multibrotação .....	14
Preparo de meio MS para crescimento e enraizamento dos brotos .....	15
Coleta, assepsia e extração de explantes .....	17
Preparo da solução de colchicina e sua aplicação para duplicação somática de cromossomos e pós-tratamento .....	21
<b>Comentários finais</b> .....	<b>23</b>
<b>Referências</b> .....	<b>24</b>





# Protocolos para Assepsia de Meristemas e Cultura de Tecidos para o Gênero *Brachiaria* (Trin.) Griseb e Melhor Tratamento para Duplicação de Número Cromossômico

---

*Carine Simioni*<sup>1</sup>

*Cacilda Borges do Valle*<sup>2</sup>

## Resumo

O objetivo neste trabalho é divulgar os protocolos utilizados na Embrapa Gado de Corte para a assepsia e micropropagação *in vitro* de explantes de braquiária. Estes foram coletados *in vivo* para a cultura de tecidos, com a finalidade de otimizar a micropropagação e a poliploidização de genótipos diplóides. A metodologia utilizada resultou na duplicação somática efetiva de algumas plantas do gênero. O domínio dessas técnicas contribui extraordinariamente para a economia de tempo e espaço em obter genótipos valiosos ao programa de melhoramento da referida gramínea. Plantas duplicadas permitirão o melhoramento intra-específico nesse gênero, caracterizado por plantas apomíticas tetraplóides de grande importância agrônoma.

**Termos para indexação:** braquiária, cultivo *in vitro*, duplicação cromossômica, melhoramento genético vegetal.



# Protocols for Meristem Cleansing and Tissue Culture in *Brachiaria* and Best Treatment for Chromosome Duplication

---

## Abstract

*This paper describes the protocols used by Embrapa Beef Cattle for the cleansing and in vitro culture of Brachiaria spp. explants. These were extracted from in vivo plants with the objective of optimizing micro propagation and polyploidization of diploid genotypes. The methodology used resulted in somatic duplication of the chromosome numbers in some plants of this genus. The success of these techniques contributes enormously to the economy in time and space needed to obtain valuable genotypes for the breeding program. Duplicated plants will allow intraspecific breeding in the genus characterized mostly by tetraploid apomictic genotypes of considerable agronomic importance.*

***Index terms:*** *Brachiaria, in vitro cultivated, double chromosome, plant breeding.*

## Introdução

Extensas pastagens de *Brachiaria* (Trin.) Griseb são a base da produção animal no Brasil Central. Porém, por serem poucas as cultivares e de reprodução apomítica (assexuada), na qual o embrião se desenvolve por partenogênese, gerando uma planta idêntica à planta-mãe (Dusi; Willemse, 1999), a variabilidade genética é baixa, persistindo um alto risco de ocorrência de pragas ou doenças. Para ampliar a base genética e permitir a exploração de genótipos conservados pela apomixia em *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria brizantha*, as duas espécies mais importantes nesse contexto, é possível utilizar a sexualidade identificada em alguns acessos em cruzamentos intra-específicos. Para isso, é necessário, primeiramente, duplicar cromossomos dos acessos diplóides de reprodução sexual para igualar a ploidia com os acessos apomíticos tetraplóides. Cruzamentos intra-específicos poderão gerar progênies híbridas com características desejáveis, além de superar os problemas de esterilidade e má produção de sementes que já foram verificados em híbridos interespecíficos produzidos em um programa de melhoramento de *Brachiaria* em andamento na Embrapa Gado de Corte desde o ano de 1988.

Em programas de melhoramento de plantas, a produção de poliplóides artificiais para as mais diversas finalidades é de uso freqüente, sendo a duplicação somática feita basicamente com a utilização de uma substância antimitótica, das quais a mais famosa é a colchicina. A aplicação pode ser nas sementes, plantas jovens ou partes vegetativas com tecidos meristemáticos ativos, como afilhos e estolhos, por exemplo. Para aumentar a quantidade de plantas viáveis e assim proceder à duplicação cromossômica, meristemas podem ser tratados diretamente em um meio de cultura *in vitro* (Mello e Silva et al., 2000). Essa técnica pode solucionar problemas práticos, como a manutenção de genótipos, multiplicação por propagação vegetativa, conservação de germoplasma e outros. O cultivo pode iniciar pela extração de qualquer parte da planta, como gemas, raízes, protoplastos, ou embriões, colocada em um meio nutritivo sob condições controladas e em recipiente asséptico (Pinheiro et al., 2000), e permite produzir plantas isentas de patógenos. Para certas culturas, a técnica

ainda não foi estabelecida satisfatoriamente. A micropropagação *in vitro*, que visa multiplicar rapidamente genótipos promissores, torna os programas de melhoramento genético mais dinâmicos.

Rodrigues-Otubo et al. (2000) sugeriram a cultura de calos para regenerar plantas diplóides de *B. brizantha* e *B. decumbens* com fins de duplicação do número cromossômico. Isto pode viabilizar, de maneira eficiente, as hibridações diretas entre os acessos dessas espécies.

Experimentos com cultura de tecidos envolvem processos laboriosos, desde a coleta de explantes no campo até o controle da contaminação dos meios, requerendo uma grande quantidade de material vegetal e um longo período de tempo para aquisição de quantidade considerável de explantes. Além disso, meios de cultura que induzam a multibrotação de meristemas e, a seguir, o crescimento e enraizamento das plântulas, requerem testes extensivos. Os objetivos neste trabalho foram: estabelecer protocolo de assepsia para explantes de acessos de *Brachiaria* coletados no campo, estabelecer um protocolo para cultura de tecidos no gênero e divulgar a metodologia de duplicação cromossômica somática que resultou na tetraploidização de plantas originalmente diplóides e de reprodução sexual.

## Materiais

O trabalho foi conduzido nos Laboratórios de Biotecnologia Vegetal e de Citogenética Vegetal da Embrapa Gado de Corte, unidade descentralizada da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Campo Grande, MS.

Os materiais vegetais utilizados foram os acessos diplóides de reprodução sexual de *B. decumbens* identificados sob os códigos D4, D5, D6, D18, D24, D25, D27, D30, D35 e D40. As matrizes foram coletadas no campo de germoplasma mantido na Embrapa Gado de Corte na forma de perfilhos. Também foram feitos testes de cultivo *in vitro* de híbridos diplóides sexuais entre *B. decumbens* e *B. brizantha* que foram produzidos nesse Centro de Pesquisa, nos anos de 1992 (três plantas híbridas testadas) e 1996 (três plantas híbridas testadas).

## Metodologia

### Cultivo de meristemas *in vitro*

Para melhor organizar os trabalhos de cultivo *in vitro*, é importante seguir as etapas:

- Preparo de soluções-estoque (pesagem de sais, vitaminas e fitorreguladores, diluições).
- Esterilização de materiais de uso na capela de fluxo laminar (pinças, bisturis, vidros e outros) e assepsia da sala de fluxo laminar.
- Preparo e esterilização dos meios de cultura.
- Coleta, assepsia e extração de meristemas.
- Controle de contaminação dos explantes em meio de cultura.

### Preparo de soluções-estoque

As substâncias e respectivas quantidades para preparo das soluções-estoque (macronutrientes, micronutrientes, vitaminas e fitorreguladores) utilizadas nos meios de cultura encontram-se descritas nas Tabelas 1, 2, 3 e 4. Para o preparo das soluções de micro e macronutrientes, os sais, depois de pesados, devem ser colocados em um béquer seco, adicionado-se um pouco de água destilada para agitação e, depois de diluído, ajustado o volume final em proveta (Fig. 1a). Todos os micronutrientes que compõem a solução G (Tabela 2), depois de pesados, são estocados juntos, em um único recipiente. As soluções-estoque devem ser mantidas em refrigerador até sua utilização. Para o preparo de 100 mL, 200 mL, 250 mL ou 500 mL de soluções-estoque, dependendo da demanda do trabalho, faz-se um ajuste das quantidades por meio de regras de três.

**Tabela 1.** Concentração de substâncias para solução-estoque de macronutrientes (soluções A, B, C, D, E, F) para meios de cultura vegetal, segundo Linsmaier e Skoog (1965).

Sais	Concentração (g/L)
A – $\text{NH}_4\text{NO}_3$ (nitrato de amônio)	165
B – $\text{KNO}_3$ (nitrato de potássio)	190
C – $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (cloreto de cálcio)	44
D – $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de magnésio)	37
E – $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (fosfato de potássio)	17
F – $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}^{(1)}$ (sulfato ferroso) + $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (sódio EDTA)	2,78 3,72

<sup>(1)</sup> Preparar essa solução sob aquecimento; depois acrescentar a diluição do  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e ajustá-la ao volume final.

**Tabela 2.** Concentração de substâncias na solução-estoque de micronutrientes (solução G) para meios de cultura vegetal segundo Linsmaier e Skoog (1965).

Sais	Concentração (mg/L)
1 <sup>(1)</sup> – $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (cloreto de cobalto)	0,025
2 <sup>(1)</sup> – $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de cobre)	0,025
3 – $\text{H}_3\text{BO}_3$ (ácido bórico)	6,2
4 – KI (iodeto de potássio)	0,83
5 – $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de manganês)	22,3
6 – $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (molibdato de sódio)	0,25
7 – $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de zinco)	8,6

<sup>(1)</sup> 1 e 2: Fazer dois subestoques: 0,005 g em 100 mL<sup>®</sup> depois agitar bem e pipetar: 10 mL de cada uma das soluções no estoque de 200 mL com os demais sais, 12,5 mL no estoque de 250 mL com os demais sais ou 25 mL no estoque de 500 mL com os demais sais.

**Tabela 3.** Preparo de solução-estoque de vitaminas de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e LS (LINSMAIER; SKOOG, 1965) para meios de cultura vegetal.

Quantidade das vitaminas	Volume das soluções-estoque
Ácido nicotínico: 0,010 g	200 mL
Piridoxina: 0,01 g	200 mL
Mioinositol (ou inositol): 0,01 g	100 mL
Tiamina: 0,01 g	200 mL (para o meio MS)
Tiamina: 0,0004 g	50 mL (para o meio LS)

**Tabela 4.** Preparo de solução-estoque de hormônios para meios de cultura vegetal.

**Soluções-estoque de fitorreguladores<sup>(1)</sup> – todos: 0,001 g/L**

KIN (cinetina)

ANA (ácido naftaleno acético)

BAP (benzilaminopurina)

<sup>(1)</sup> Estas soluções não diluem facilmente; é necessário **pesar 0,02 g** de cada hormônio, adicionar um pouco de água e dissolvê-los com algumas gotas de NaOH 1M, agitando sempre. Depois de dissolvido, acrescentar água destilada até o **volume final de 20 mL** e **armazenar em geladeira, no escuro**.

### **Esterilização de materiais de uso rotineiro**

Os materiais utilizados para extração, como placas de Petri, pinças, bisturis, os vidros com tampa para colocar as soluções de assepsia e a água destilada devem ser autoclavados, para minimizar os riscos de contaminação (Fig. 1b). E devem ser usados sempre na capela de fluxo laminar também asséptica.

### **Preparo de meio LS para multibrotação**

O meio de cultura LS (LINSMAIER; SKOOG, 1965) adaptado por Pinheiro (1996), para induzir a multibrotação dos meristemas (Fig. 1c, 1d, 1e), é preparado com a seguinte composição:



Para fazer 1 litro de meio de cultura LS:

- Sacarose: 20 g
- Caseína: 0,1 g
- Sais: soluções-estoque de macronutrientes **A, B, C, D, E, F**: 10 mL cada; solução **G** (micronutrientes): 10 mL
- Vitaminas de LS: tiamina (1mL) e mioinositol (10mL)
- Fitorreguladores<sup>(1)</sup>: ANA: 1mL, KIN: 3mL, BAP: 3 mL
- pH: 5,7-5,8; ajustado no pHmetro com NaOH 0,1 N.

<sup>(1)</sup>A composição dos fitorreguladores foi modificada especialmente para *B. decumbens*.

Por fim, após acrescentar o ágar (9 g), a mistura é levada ao microondas e fervida por cerca de nove minutos ou até levantar bolhas na superfície.

Depois, é distribuída, ainda quente, nos vidros, imediatamente tampados e embalados com filme de plástico para serem autoclavados por 18 minutos. Depois de autoclavados, os vidros contendo os meios de cultura são armazenados em refrigerador até serem utilizados. Para cada litro de meio LS preparado, é possível distribuí-lo em cerca de 40 vidros de 100 mL (Fig. 1c).

### **Preparo de meio MS para crescimento e enraizamento dos brotos**

O meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962, modificado) (Fig. 1f, 1g, 1h) é preparado como descrito a seguir:

Para 1 litro de meio de cultura MS:

- Sacarose: 45 g
- Sais: soluções-estoque de macronutrientes **A, B, C, D, E, F**: 10 ml cada; solução **G** (micronutrientes): 5 ml
- Vitaminas de MS: ácido nicotínico (10 mL), piridoxina (10 mL), tiamina (10 mL)
- Inositol: 10 mL
- Hormônio ANA: 1mL
- pH: 5,7-5,8 ajustado no pHmetro com NaOH 0,1N.

Após acrescentar o ágar (9g), a mistura levada ao microondas é aquecida em potência máxima por cerca de nove minutos ou até levantar bolhas na superfície. Depois é distribuída, ainda quente, nos tubos de ensaio, tampa-

dos e embalados com filme de plástico (Fig. 1f) para serem autoclavadas por 18 minutos. É preferível deixar solidificar em posição inclinada e à temperatura ambiente, após autoclavar. Após a solidificação dentro dos tubos de ensaio, estes são mantidos em refrigerador até serem utilizados.

Fotos: Carine Simioni



**Fig. 1.** a) Preparo de soluções-estoque de sais, hormônios e vitaminas para os meios de cultura vegetal; b) materiais de uso rotineiro para extração de meristemas; c) meio LS (LINSMAIER; SKOOG) distribuído nos frascos antes de ser utilizado; d) explantes em meio LS antes do tratamento com colchicina; e) multibrotação dos brotos em meio LS; f) meio MS (MURASHIGE; SKOOG) distribuído nos tubos de ensaio antes de ser utilizado; g) plântulas em meio MS para crescimento e enraizamento; h) mostra do segmento basal (seta) usado como explante para ser submetido ao meio LS com colchicina.

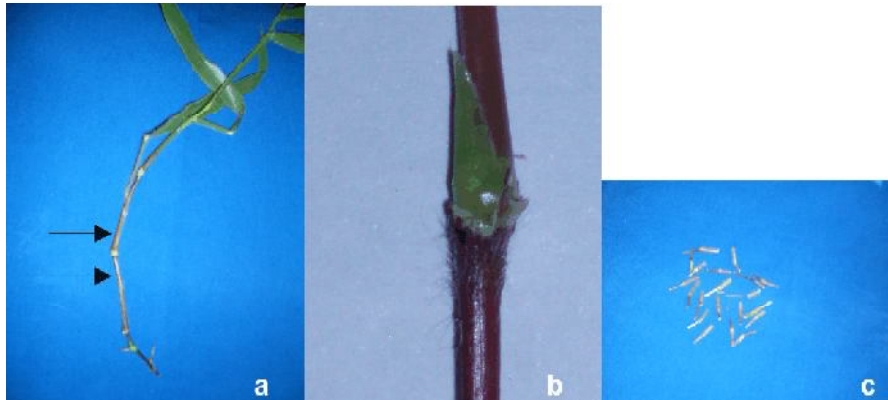
### Coleta, assepsia e extração de explantes

A coleta, assepsia, extração dos explantes de *Brachiaria* e demais procedimentos seguem as seguintes etapas:

**No campo:** coleta de hastes das plantas contendo as gemas laterais (Fig. 2 a, 2b).

**Em laboratório:** segmentos dos caules contendo as gemas laterais são cortados (Fig. 2c) e, logo após, lavados com detergente neutro e enxaguado com água destilada. Se as hastes estiverem muito contaminadas com terra vinda do campo, estas são limpas com uma escova macia para eliminar o excesso de sujeira.

Fotos: Carine Simioni



**Fig. 2.** a) Caule das plantas de *Brachiaria decumbens* contendo as gemas laterais (as setas indicam os pontos do corte para a coleta dos meristemas); b) meristema lateral; c) gemas laterais cortadas antes da extração dos meristemas.

**Na câmara de fluxo laminar:** primeiramente, as gemas laterais dos caules das plantas contendo os explantes são submetidas às seguintes soluções para limpeza (Fig. 3a):

- Explantes mantidos por 2 minutos em etanol 70%.
- Explantes mantidos por 20 minutos em hipoclorito 50%.
- Três lavagens com água destilada autoclavada.
- Explantes mantidos por 2 minutos em etanol 70%.
- Explantes mantidos por 10 minutos em hipoclorito 10%.
- Três lavagens com água destilada autoclavada.

Foto: Carine Simioni

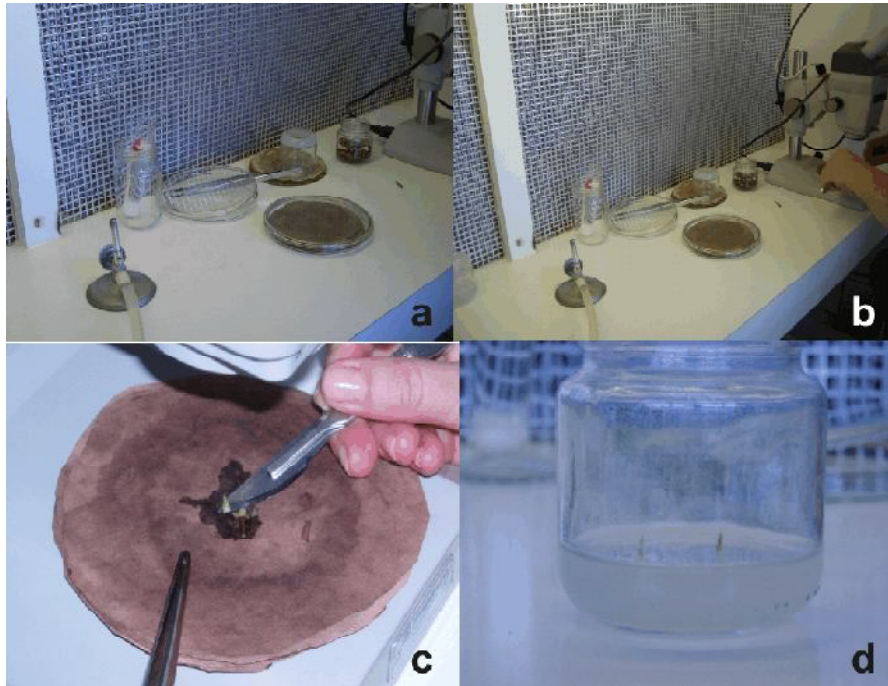


**Fig. 3.** Vidros contendo as soluções de assepsia das gemas laterais de *Brachiaria decumbens*.

Os explantes contendo os meristemas permanecem no vidro da última lavagem com água destilada autoclavada e imediatamente inicia-se a extração, sob microscópio estereoscópico dentro da câmara de fluxo laminar. Cada meristema extraído deve ser imediatamente inoculado nos vidros fechados com filme de plástico contendo o meio de cultura LS (LINSMAIER; SKOOG, 1965) (Fig. 4). Em cada vidro são colocados cinco meristemas.

Após o crescimento, os meristemas multibrotados (Fig. 1e) devem ser repicados em câmara asséptica com bisturi e lâminas esterilizadas e imediatamente transferidos para tubos de ensaio contendo meio MS para o crescimento e enraizamento (Fig. 1f, 1g, 1h).

Fotos: Carine Simioni



**Fig. 4.** a,b) Materiais utilizados para a extração dos meristemas sob lupa; c) meristema extraído sob microscópio estereoscópico; d) meristemas em meio LS (LINSMAIER; SKOOG) antes de serem colocados na câmara de germinação.

**Na câmara de germinação:** os meristemas, brotos e plântulas antes, durante e após o tratamento com colchicina, tanto no meio LS quanto no meio MS, são cultivados sob uma temperatura de 23°C com fornecimento de luz artificial por meio de lâmpadas fluorescentes acopladas à câmara de germinação, totalizando um fotoperíodo de 16 horas-luz (Fig. 5).

**Controle de contaminação:** é importante verificar as condições dos explantes dentro dos meios de cultura diariamente. Para manter a limpeza e assepsia, verificam-se os vidros e tubos de ensaio que estão contaminados com fungos e bactérias. Estes devem ser levados à câmara de fluxo laminar e os explantes não atingidos pela contaminação devem ser removi-

dos e transferidos, utilizando vidros e tubos de ensaio com meios de cultura novos. Vidros e tubos de ensaio contaminados devem ser descartados e autoclavados para eliminar os microorganismos antes de serem lavados em água corrente e sabão. Quando a contaminação é por fungos, descartam-se todos os explantes, mesmo os que não foram atingidos visualmente pelos microorganismos (Fig. 6).

Foto: Carine Simioni



**Fig. 5.** Cultivo de meristemas de *Brachiaria decumbens*, brotos e plântulas em câmara de germinação.

**Fig. 6.** Explante contaminado por bactéria (seta).

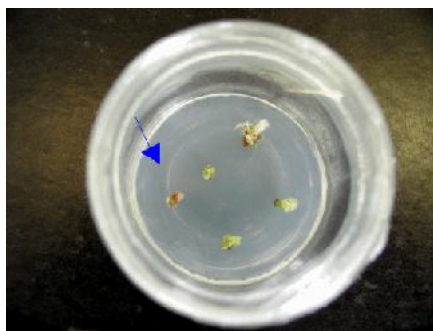


Foto: Carine Simioni

### Preparo da solução de colchicina e sua aplicação para duplicação somática de cromossomos e pós-tratamento

Após cerca de 30 dias (período variável conforme os genótipos), os brotos produzidos no meio MS são individualizados (sempre na câmara de fluxo laminar) e a duplicação do número cromossômico deve ser realizada a partir do segmento basal dos explantes enraizados (Fig. 1h), inoculados em meio LS suplementados com colchicina (Fig. 7). Um experimento anterior conduzido por Pinheiro et al. (2000), testando protocolos para duplicação do número cromossômico em *B. brizantha*, com a aplicação de colchicina em explantes cultivados *in vitro*, demonstrou que a eficiência da duplicação depende da concentração e do tempo de exposição dos explantes à droga. Nesse experimento, no tratamento com os melhores resultados obtidos pelos autores, foi utilizado: 0,01 % de colchicina por 48 horas.



**Fig. 7.** a) Solução de colchicina sendo adicionada ao meio LS (LINSMAIER; SKOOG) com o auxílio de um filtro milipore estéril de 0,45  $\mu\text{m}$  de espessura do poro; b,c) meristemas em meio LS suplementado com colchicina.

A solução-estoque contendo colchicina nessa concentração é feita pesando-se 0,1 g em 10 mL de água destilada autoclavada. Essa solução fica no refrigerador até sua utilização.

A cada 100 mL de meio LS preparado para receber o antimitótico, 1 mL da solução-estoque é adicionado com uma seringa estéril e descartável, utilizando um filtro milipore também estéril, com 0,45  $\mu\text{m}$  de espessura do poro (Fig. 7a), em câmara de fluxo laminar.

As concentrações das substâncias necessárias para fazer 100 mL de meio LS estão descritas a seguir:

Para fazer 100 mL de meio de cultura LS:

- Sacarose: 2 g
- Caseína: 0,01 g
- Sais: soluções-estoque de macronutrientes **A, B, C, D, E, F**: 1 mL cada; solução **G** (micronutrientes): 1 mL
- Vitaminas de LS: tiamina (0,1 mL) e mioinositol (1 mL).
- Hormônios\*: ANA: 0,1mL; KIN: 0,3 mL; BAP: 0,3 mL
- pH: 5,7-5,8; ajustado no pHmetro com NaOH 0,1 N.

Depois, é acrescentado o ágar (0,9 g) e a mistura é levada ao microondas (deixar ferver por aproximadamente 2 minutos).

Os 100 mL de meio contendo o antimetabólito podem ser distribuídos em cinco placas de Petri autoclavadas onde serão colocados os meristemas basais para submetê-los ao tratamento (Fig. 7b, 7c).

Após 48 horas de inoculação em meio suplementado com a solução de colchicina, os segmentos basais (meristemas) tratados voltam ao meio de cultura LS sem colchicina, para a multibrotação. Embora seja um antimetabólito de baixa toxicidade, o tratamento com essa droga leva grande quantidade de explantes à necrose. Por isso, o grande cuidado com a manipulação. Mesmo assim, ocorrem muitas perdas.

Os explantes sobreviventes em meio LS são repicados novamente para o meio de enraizamento (MS) e os que alcançam bom desenvolvimento são transferidos para copinhos de plástico com vermiculita e areia, na proporção 3:1 para a aclimação, e depois as plantas são transferidas para vasos com terra.



## Comentários finais

A metodologia utilizada para assepsia de explantes de plantas de braquiária, tanto para *B. decumbens* quanto para os híbridos testados, encontra-se definida.

O protocolo de composição e preparo de meio de multibrotação (LS) mostrou-se eficiente para sua utilização nos acessos de *B. decumbens* e nas plantas híbridas avaliadas. Porém, por causa das diferenças genótípicas e ambientais, alguns se mostraram mais responsivos que outros, produzindo um grande número de brotos a partir de um único meristema cultivado, como foi o caso do D24.

O meio MS de crescimento e enraizamento mostrou-se eficiente. Em menos de 30 dias, foi possível observar um forte enraizamento na maioria das plantas, indicando ser o período ideal para retirá-los dos tubos de ensaio e proceder à continuidade do experimento.

Após a superação das dificuldades inerentes à primeira etapa de experimentos envolvendo cultura de tecidos *in vitro*, devem ser definidas as próximas etapas. No trabalho conduzido por Simioni e Valle (2005, 2006a, 2006b), cujo objetivo foi a duplicação do número cromossômico de *B. decumbens* diplóide de reprodução sexual, sua continuidade baseou-se nas avaliações das plantas que sobreviveram ao tratamento com colchicina. Estas consistiram na confirmação da duplicação cromossômica em análises de pontas de raiz (mitose) e em anteras (meiose), na avaliação do modo de reprodução, no comportamento meiótico e na viabilidade do pólen para estudos de fertilidade. Estes estudos constituíram a base para os cruzamentos feitos entre as plantas tetraploidizadas, que serviram de genitores femininos (fonte de variabilidade genética) em cruzamentos com acessos apomíticos doadores de pólen (Simioni; Valle, 2008). Esses cruzamentos têm como objetivo produzir progênies híbridas intra-específicas com maior variabilidade genética, que fixem genótipos superiores por meio da apomixia e que produzam boa quantidade de sementes viáveis.

## Referências

- DUSI, D. M. de A.; WILLIEMSE, M. T. M. Apomixis in *Brachiaria decumbens* Stapf.: gametophytic development and reproductive calendar. **Acta Biologica Cracoviensa**, Series Botanica, Cracow, v. 41, p. 151-162, 1999.
- LINSMAIER, E. M.; SKOOG, F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 18, p. 100-127, jan. 1965. Issue 1.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, July 1962. Issue 3.
- PINHEIRO, A. A.; POZZOBON, M. T.; VALLE, C. B. do; PENTEADO, M. I. de O.; CARNEIRO, V. T. C. Duplication of the chromosome number of diploid *Brachiaria brizantha* plants using colchicine. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 19, n. 3, p. 274-278, jan. 2000.
- PINHEIRO, A. A. **Relação entre o nível de ploidia e a estrutura do saco embrionário de plantas de *Brachiaria brizantha* (Gramineae), duplicadas por colchicina**. 1996. 40 f. Monografia (Bacharelado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- RODRIGUES-OTUBO, B. M.; PENTEADO, M. I. de O.; VALLE, C. B. do. Embryo rescue of interespecific hybrids of *Brachiaria* spp. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Hague, v. 61, n.3, p. 175-182, jan. 2000.
- MELLO E SILVA, P. A. K. X. de; CALLEGARI-JACQUES, S.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl (Orchidaceae) by *in vitro* techniques. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 30, n.1, jan./mar. p. 105-111, 2000.
- SIMIONI, C.; VALLE, C. B. do. Viabilização de cruzamentos intra-específicos no gênero *Brachiaria*. In: JORNADA CIENTÍFICA DA EMBRAPA GADO DE CORTE, 1., 2005, Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2005. 1 CD-ROM.

SIMIONI, C.; VALLE, C. B. do. Indução de poliploidia em *Brachiaria decumbens* através de cultura de tecidos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43., 2006, João Pessoa. **Produção animal em biomas tropicais: anais.** João Pessoa: Sociedade Brasileira de Zootecnia: UFPB, 2006a. 1 CD-ROM.

SIMIONI, C.; VALLE, C. B. do. Duplicação cromossômica em *Brachiaria decumbens* In: JORNADA CIENTÍFICA DA EMBRAPA GADO DE CORTE, 2., 2006, Campo Grande, MS, Anais [da]... 2. ed. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2006b. 1 p. 1 CD-ROM.

SIMIONI, C.; VALLE, C. B. do. *Brachiaria decumbens* (A. Rich.) Stapf tetraplóide sexual: uma nova fonte de variabilidade genética In: JORNADA CIENTÍFICA DA EMBRAPA GADO DE CORTE, 3., 2007, Campo Grande, MS. **Anais.** Embrapa Gado de Corte, [2008] 1 CD-ROM. (no prelo).

**Embrapa**

---

*Gado de Corte*

**Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento**

**Governo  
Federal**

CGPE 7735