

**Micropropagação e Cultivo *in vitro*
de Gramíneas Forrageiras Tropicais**



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

Documentos 142

Micropropagação e Cultivo *in vitro* de Gramíneas Forrageiras Tropicais

Leônidas Paixão Passos

Maurício Marini Köpp

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Gado de Leite

Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Bairro Dom Bosco

36038-330 Juiz de Fora – MG

Telefone: (32)3311-7405

Fax: (32)3311-7424

Home page: <http://www.cnppl.embrapa.br>

E-mail: sac@cnppl.embrapa.br

Supervisão editorial: Leônidas Paixão Passos

Editoração eletrônica e tratamento das ilustrações: Adriana Guimarães e Carlos Alberto Medeiros de Moura

Normalização Bibliográfica: Inês Maria Rodrigues

Arte da capa: Moema Sarrapio (estagiária)

1ª edição

1ª impressão (2010): 100 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 Leite

Passos, Leônidas Paixão.

Micropropagação e cultivo *in vitro* de gramíneas forrageiras tropicais / Leônidas Paixão Passos e Maurício Marini Köpp. – Juiz de Fora : Embrapa Gado de Leite, 2010.

20 p. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 142.).

ISSN 1516-7453

1. Melhoramento genético vegetal. 2. Forrageiras – disponibilização de germoplasma. 3. Gramíneas – conservação *in vitro*. I. Köpp, Maurício Marini. II. Título. III. Série.

CDD 633.2

Autores

Leônidas Paixão Passos

Engenheiro-agrônomo, Ph.D. – Embrapa Gado de Leite
Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Bairro Dom Bosco
36038-330 – Juiz de Fora, MG
lpassos@cnpqgl.embrapa.br

Maurício Marini Köpp

Engenheiro-agrônomo, D.Sc. – Embrapa Pecuária Sul
BR 153 Km 603 – Vila Industrial
Caixa Postal 242
96401-970 – Bagé, RS
mauricio.kopp@cppsul.embrapa.br

Apresentação

A tecnificação nos sistemas produtivos brasileiros de leite e de carne verificada nas últimas décadas, em consequência da globalização da economia, tem demandado novas alternativas, para a manutenção da sustentabilidade produtiva. Nesse contexto, a melhoria da alimentação do gado constitui um elemento chave, e a produção e oferta de forragens de qualidade assumem papel primordial.

Uma das vertentes para o atendimento dessas demandas é o melhoramento genético de forrageiras, para o qual a conservação e disponibilização de germoplasma se torna crucial. Além disso, existe demanda para a rápida multiplicação de genótipos promissores, principalmente para as espécies com propagação vegetativa preferencial.

Considerando o exposto, a micropropagação e a conservação *in vitro* de gramíneas forrageiras se apresentam com alternativas viáveis para concretizar a agilidade necessária aos programas de melhoramento genético e também ao progresso dos sistemas produtivos, visto que cultivares de baixa disponibilidade, porém com elevada procura, podem ser rapidamente introduzidas nos referidos sistemas.

A Embrapa Gado de Leite tem se dedicado à micropropagação e conservação *in vitro* de espécies forrageiras há mais de uma década. A presente publicação representa um resumo das recomendações técnicas para o assunto.

Duarte Vilela
Chefe-geral

Sumário

Introdução	9
Definições	10
Abreviaturas e Símbolos.....	10
Materiais e equipamentos	11
Para a introdução de cultivos.....	11
Para a repicagem dos cultivos.....	11
Metodologia	12
Preparo das condições de trabalho	12
Coleta de explantes vegetais	12
Desinfecção de explantes	12
Manipulação vegetal	13
Aclimação de plântulas micropropagadas	14
Registros	14
Conclusões	14
Referências Bibliográficas.....	15
Figuras... ..	16

Introdução

Esta publicação descreve as técnicas utilizadas para cultivo *in vitro* de plântulas de gramíneas forrageiras tropicais, objetivando a micropropagação, conservação de germoplasma, melhoramento genético ou avaliações metabólicas.

No Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia Vegetal da Embrapa Gado de Leite, essas técnicas estão otimizadas para as seguintes espécies: *Brachiaria brizantha*, *B. decumbens*, *B. ruziziensis*, *Pennisetum purpureum* e *Saccharum officinarum*.

Como em todas as práticas em ambiente controlado, registra-se a necessidade constante da observância de boas práticas laboratoriais.

Definições

EXPLANTE: *Célula, tecido ou órgão de uma planta usado para iniciar culturas in vitro.*

IN VITRO: *Todo processo biológico que se desenvolve em lugar fora dos sistemas vivos, no ambiente controlado e fechado de um laboratório e que são feitos normalmente em recipientes de vidro.*

MICROPROPAGAÇÃO: *Propagação clonal rápida in vitro de plantas a partir de células, tecidos ou órgãos cultivados assepticamente em meio de cultura definido e mantidos sob condições controladas de luz e temperatura.*

EXPURGO: *é o processo de expurgar, expelir, expulsar, exilar ou eliminar contaminações, no sentido de desfazer-se do microrganismo contaminante.*

ACLIMATAÇÃO: *Processo pelo qual plantas se ajustam fisiologicamente e anatomicamente das condições de cultivo e ambientais in vitro para as condições ex vitro em sistemas vivos.*

OXIDAÇÃO: *Reação do oxigênio com íons metálicos (+) dos outros compostos do meio de cultivo. Os explantes ao serem inoculados podem liberar exsudados que tornam o meio de cultivo escuro. Este tipo de escurecimento é consequência da liberação de fenóis dos ferimentos ocasionados no processo de extração dos explantes.*

Abreviaturas e Símbolos:

MAA – Meristemas axilares e apicais.

Meio MS – Meio de Murashige e Skoog modificado.

Meio BA – Meio MS + ácido indolbutírico e 6-Benzilaminopurina + sacarose + ágar.

Meio NAA – Meio MS + ácido naftalenoacético + sacarose + ágar.

Meio MCC – MS + ácido indolbutírico e 6-Benzilaminopurina + sacarose + carvão ativado + ágar.

Materiais e Equipamentos

Para a Introdução de Cultivos:

- Água deionizada estéril autoclavada;
- Álcool comercial 70% (v/v);
- Algodão;
- Autoclave;
- Béquer;
- Cabos de bisturi e bisturis;
- Capela de fluxo laminar horizontal;
- Filme PVC 17 μm ;
- Funil;
- Hipoclorito de sódio 1% + Triton x-100;
- Lâmpara;
- Meio de cultivo BA;
- Pinças;
- Placas de petri grande com papel filtro;
- Placas de petri pequenas;
- Tesoura ou podão;
- Tubos de ensaio pequenos e grandes.

Para a Repicagem dos Cultivos:

- Álcool comercial 70% (v/v);
- Autoclave;
- Cabos de bisturi e bisturis;
- Capela de fluxo laminar horizontal;
- Filme PVC 17 μm ;
- Formol 40%;

- Lamparina;
- Meio de cultivo NAA, BA ou MCC;
- Pinças;
- Placa de petri grande com papel filtro;
- Placas de petri pequenas.

Metodologia

Preparo das condições de trabalho

A capela de fluxo laminar deve ser previamente desinfestada com álcool (etanol) 70% e submetida à ação de luz ultravioleta por um período mínimo de 20 minutos.

Todos os acessórios e equipamentos utilizados, bem como os meios de cultura, devem ser esterilizados em autoclave por no mínimo 20 minutos e, antes o uso, inseridos dentro da capela de fluxo laminar para exposição à luz ultravioleta por um período mínimo de 20 minutos.

Pelo menos uma vez por semana deve ser realizado expurgo da capela de fluxo laminar. Este procedimento deve ser realizado espalhando-se formol 40% sobre a bancada da capela no horário de término do expediente e mantendo-se a exaustão da capela ligada, por no mínimo, 12 horas.

Coleta de explantes vegetais

Escolher explantes provenientes de plantas matrizes ou básicas sadias para efetuar a coleta. Caso não existam para a cultivar desejada, coletar os explantes de plantas morfológicamente caracterizadas e adequadamente cultivadas, de preferência no interior de casa de vegetação. São coletados meristemas axilares e apicais (MAA) das plantas que serão cultivadas *in vitro*.

Desinfecção de explantes

Realizar esta etapa em laboratório. Lavar os explantes em água corrente, removendo-se as folhas externas. Em seguida, desinfestar os mesmos, mergulhando-os completamente em um tubo de

ensaio em soluções à base de álcool 70% por 5 minutos e a seguir hipoclorito de sódio 1% + Triton x-100 por 30 minutos. Finalmente, sob condições assépticas, no interior de câmara de fluxo laminar, lavar os explantes com água destilada esterilizada em autoclave, por três vezes, com auxílio de um funil e béquero para a completa remoção dos resíduos de cloro.

Manipulação vegetal

Introdução de Materiais Vegetais

Assim que os explantes estiverem desinfestados, retirar os MAA de cada explante, utilizando uma pinça e um bisturi. Coletar sementes com auxílio apenas de pinça.

Durante a realização destas atividades, a pinça e o bisturi devem ser frequentemente flambados mergulhando-os em álcool comercial e colocando-os em contato com a chama da lamparina.

A manipulação dos explantes deve ser realizada dentro de uma placa de petri grande sobre uma folha de papel filtro. Esta folha de papel filtro deve ser trocada sempre que se inicie a manipulação de um novo explante.

Inserir os MAA retirados do explante em meio BA e em seguida selar com filme de PVC com no mínimo duas camadas. Este procedimento deve ser realizado o mais rápido possível para evitar a oxidação do explante.

Rotular os frascos contendo os MAA ou sementes com auxílio de caneta tipo marcador permanente e datar.

Repicagem

Para a repicagem, proceder a abertura dos frascos com plântulas já micropropagadas, retirar a plântula sobre a placa de petri com o papel filtro e proceder da mesma maneira utilizada para a introdução, ou seja, remover as plântulas ou seus MMA, e inserir os mesmos em um novo

frasco. A escolha do meio para acondicionamento destes explantes dependerá do nível de desenvolvimento da plântula. Utilizar meio MCC para plântulas mais desenvolvidas e BA para MAA e plântulas menos desenvolvidas.

Aclimação de plântulas micropropagadas

Para aclimação, transferir as plântulas para copos plásticos de 200 mL contendo água destilada e mantê-las na câmara de crescimento por 2 dias. Após este período, transferir as plântulas para potes de 50 mL contendo vermiculita + areia (50%), adaptados à tampa de um pote de 300 mL contendo água destilada e mantê-los em câmara de crescimento por 2 dias, para então transferi-los para casa de vegetação. Em seguida, avaliar as plântulas e, assim que apresentarem desenvolvimento suficiente, transferi-las para solo em recipiente de até 10 L e posteriormente fazer o plantio definitivo no campo.

Opcionalmente, as plântulas podem ser transferidas para cultivo em solução nutritiva aerada em câmara de crescimento, por até 30 dias, objetivando melhorar as reservas nutricionais dos propágulos.

Registros

Anotar as datas de introdução, meios de cultura utilizados e datas de repicagem dos materiais em livro de registro e nos próprios frascos de cada plântula na câmara de crescimento.

Conclusões

As técnicas descritas têm se mostrado efetivas na agilização dos processos de seleção genotípica, principalmente pela detecção precoce de caracteres qualitativos.

Do ponto de vista do benefício direto ao produtor, a rápida disponibilização de materiais desejáveis também tem se revelado efetiva para a agregação de vantagens comparativas aos sistemas produtivos.

Essas técnicas podem ser facilmente adaptadas para várias outras espécies de gramíneas tropicais, além daquelas mencionadas neste documento.

Referências Bibliográficas

BORÉM, A.; VIEIRA, M. L. C. **Glossário de biotecnologia**. Viçosa, UFV, 2005. 380 p.

PASSOS, L. P. Proteínas – análise quantitativa. In: PASSOS, L. P. **Métodos analíticos e laboratoriais em fisiologia vegetal**. Coronel Pacheco: Embrapa Gado de Leite, 1996. p. 41-48.

TORRES, A. C.; CALDAS, L.; BUSO, A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília, DF:SPI-Embrapa, 1998. 509 p.



Figura 1. O trabalho com segurança é essencial.

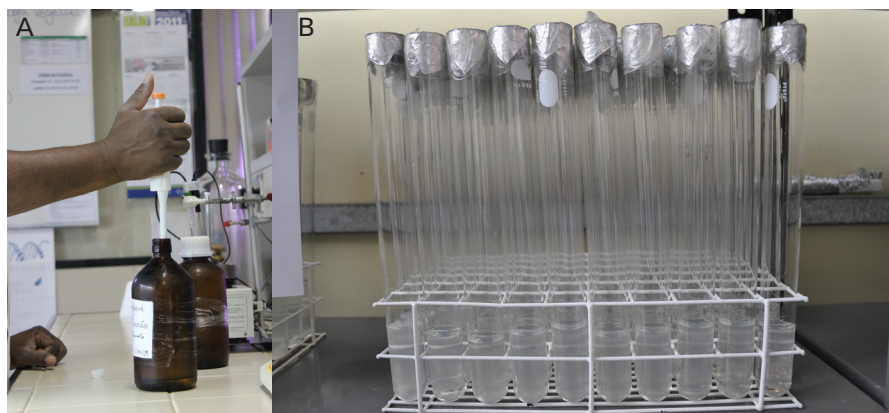


Figura 2 (A e B). Preparo de meios de cultivo.



Figura 3. A eficácia na capela de fluxo laminar é fundamental.

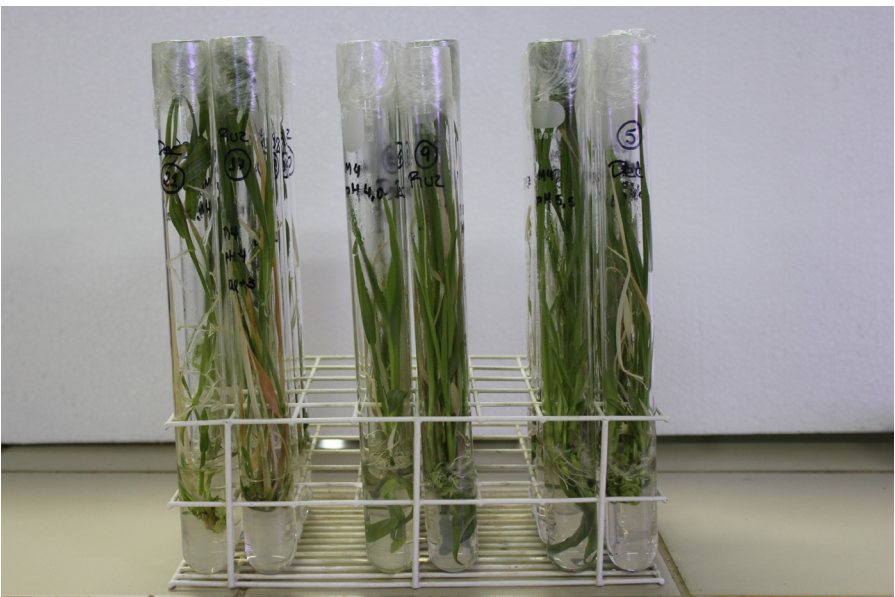


Figura 4. Conservação *in vitro* (*Brachiaria ruziziensis*).



Figura 5. Multiplicação *in vitro* (cana-de-açúcar).



Figura 6. Mudanças de cana-de-açúcar no estágio pré-aclimatação.



Figura 7. Aclimação de mudas de cana-de-açúcar.



Figura 8. Registro de dados.