

TÉCNICA DE CULTIVO MINIATURIZADO DE “BRACHIARIA” VISANDO AVALIAR OS EFEITOS DA TOXIDEZ POR ALUMÍNIO

AUTORES

LEÔNIDAS PAIXÃO PASSOS¹, MARIA COLETTA VIDIGAL¹, LEANDRA DE OLIVEIRA CRUZ², CACILDA BORGES DO VALLE³, ISABELA GOMES PERRY², ISABELA DOS SANTOS NASCIMENTO²

¹ Pesquisador, Embrapa Gado de Leite, Rua Eugênio do Nascimento, 610, Juiz Fora, MG 36038-330 – lpassos@cnppl.embrapa.br

² Estagiária, Embrapa Gado de Leite, Rua Eugênio do Nascimento, 610, Juiz Fora, MG 36038-330

³ Pesquisadora, Embrapa Gado de Corte, C.P. 154, Campo Grande, MS 79002-970

RESUMO

As pastagens do gênero “Brachiaria” não apresentam rendimento expressivo, carecendo de adaptabilidade a solos ácidos, condição agravada pela ocorrência da toxidez por alumínio. No programa de melhoramento genético liderado pela Embrapa Gado de Corte, há interesse na seleção precoce dos híbridos produzidos, e a detecção de tolerância à toxidez por alumínio é uma prioridade. O objetivo do presente estudo foi produzir plântulas miniaturizadas, por meio do cultivo “in vitro”, visando permitir essas avaliações. Plântulas viáveis do genótipo CBV-22 foram produzidas em 30 dias, em meio MS modificado, enriquecido com ácido indolbutírico. Ensaio preliminares realizados em solução nutritiva demonstraram a viabilidade desta técnica na detecção de respostas a diferentes níveis de alumínio. O crescimento foi inibido em proporção ao teor de alumínio no substrato ácido, ocorrendo morte das plântulas no nível mais elevado de alumínio (6 mg/L) após seis dias de exposição contínua. Ensaio com outros genótipos apresentaram a mesma tendência, de maneira que a necessidade de aperfeiçoamentos no método para permitir a detecção precoce de comportamento genotípico diferencial não pode ser descartada.

PALAVRAS-CHAVE

Cultura de tecidos, Forrageira, Gramínea, Micropropagação

TITLE

TECHNIQUE FOR MINIATURIZED GROWTH OF "BRACHIARIA" AIMING AT EVALUATIONS OF THE EFFECTS OF ALUMINUM TOXICITY

ABSTRACT

Pastures of the genus “Brachiaria” do not exhibit expressive yield, lacking adaptability to acidic soils, a condition aggravated by the incidence of aluminum toxicity. In the genetic breeding program led by Embrapa Beef Cattle, there is interest in obtaining early selection of the produced hybrids, and the detection of tolerance to aluminum toxicity is a priority. Aiming at resolving this problem, a study was carried out at Embrapa Dairy Cattle with the objective of developing a system for producing “in vitro” micropropagation and culture-based miniaturized seedlings, useful for evaluating the responses of this forage grass to aluminum toxicity under controlled conditions. Viable seedlings of the genotype CBV-22 were produced within 30 days, in modified MS medium, enriched with indolebutyric acid. Preliminary essays in nutrient solution demonstrated the feasibility of the proposed laboratory technique. Growth was inhibited in proportion to the aluminum content in the acidic substratum, occurring seedling death at the highest aluminum level (6 mg/L) following six days of continuous exposure. Essays with other genotypes yielded the same trend so that further refinements in the method for allowing the early detection of genotypic differential behavior are still necessary.

KEYWORDS

Forage, Grass, Micropropagation, Tissue culture

INTRODUÇÃO

O gênero “Brachiaria” ocupa mais de 80% da área de pastagens cultivadas no Brasil, evidenciando sua importância para os sistemas de produção de leite e carne. Entretanto, os índices de produtividade

alcançados não são expressivos, principalmente devido ao limitado potencial genético das cultivares em uso e à inexistência de genótipos com boa adaptabilidade a solos ácidos e de baixa fertilidade (Valle, 2001). Esse quadro é agravado pela ocorrência de toxidez por alumínio nos solos ácidos, a qual representa séria limitação à produção de forragem. A verificação precoce da existência de variabilidade de resposta a esse estresse nos genótipos de "Brachiaria" produzidos pela Embrapa Gado de Corte em seu programa de melhoramento genético constitui, portanto, uma necessidade imediata.

Visando solucionar essa limitação, este trabalho descreve um sistema miniaturizado para estudos de estresse em "Brachiaria", com base na micropropagação "in vitro". A viabilidade da metodologia para avaliar os efeitos do alumínio tóxico em plântulas regeneradas é demonstrada.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia Vegetal da Embrapa Gado de Leite. Explantes de meristemas axilares de "Brachiaria" (genótipo CBV-22) foram inoculados em meio de cultivo de Murashige e Skoog (MS) contendo 0,6% de ágar, 3% de sacarose e 3,3 μM de benzilaminopurina, e submetidos aos seguintes tratamentos: BN) adição de 1 μM de ácido naftalenoacético (ANA); BA) adição de 2,5 μM de ácido indolbutírico (AIB); ou BAN) adição de 1,25 μM de AIB e de 0,5 μM de ANA. As culturas foram mantidas em câmara com controle ambiental (280 $\mu\text{mol/s.m}^2$ de luminosidade, $30 \pm 4^\circ\text{C}$, $86 \pm 4\%$ de U.R. e 14 horas de fotoperíodo) durante 30 dias (Vidigal et al., 1998), sendo então avaliadas quanto à incidência de oxidação no meio e à altura da plântula. Os dados foram submetidos a análise estatística considerando cinco ensaios e observando o delineamento inteiramente ao acaso, com três tratamentos (meios) e quatro repetições (um explante viável por parcela). Os contrastes entre tratamentos foram comparados pelo teste de Tukey.

As plântulas do tratamento selecionado, após remoção do material seco (característico em gramíneas tropicais micropropagadas), foram pré-estressadas durante 5 minutos e cultivadas em solução nutritiva de Hoagland aerada modificada (Passos, 1996) durante quatro dias. Após nova seleção para fins de padronização, as plântulas foram expostas a um dos seguintes níveis de alumínio: 0, 4, 5, ou 6 mg/L (ppm). Foram então cultivadas por seis dias, com monitoramento e manutenção do pH em 4,3 ou menor (correções efetuadas com HCl 0,6 N) e reposição da solução a cada dois dias. O cultivo "in vivo" foi efetuado em câmara de crescimento (280 $\mu\text{mol/s.m}^2$ de luminosidade, $30 \pm 4^\circ\text{C}$, $82 \pm 6\%$ de U.R. e 16 horas de fotoperíodo). Séries de três ensaios foram conduzidos no delineamento inteiramente ao acaso, com quatro tratamentos (níveis de alumínio) e três repetições (uma plântula por parcela). Nesta avaliação preliminar, foram verificados os efeitos sobre a parte aérea da planta (altura da plântula e sobrevivência) e a variação diária do pH da solução nutritiva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos três tratamentos estudados, o meio BA propiciou os melhores resultados, em vista da tendência de produção de plântulas mais vigorosas e da menor ocorrência de oxidação no substrato, sendo seguido pelo meio BN (Tabela 1). O meio BAN não mostrou-se adequado, devido à significativa maior incidência de oxidação, a qual ocasionou perdas severas de material. Em geral, os genótipos de "Brachiaria" que estão sendo estudados têm apresentado maior sensibilidade ao estresse causado pela micropropagação "in vitro" do que outras gramíneas tropicais, tal como o capim-elefante (Vidigal et al., 1998). Tal fato pode estar sendo causado pelos meios de cultivo comparativamente mais complexos, necessários para a produção de plantas miniaturizadas.

Para todos os tratamentos, as plântulas que atingiram o final do ciclo de micropropagação mostraram-se aptas à transferência para as condições "in vivo" deste estudo, desde que submetidas a um pré-estresse de 5 minutos. Um exemplo de tubos com plântulas em condições de pronta transferência para a solução nutritiva é mostrado na Figura 1, seção A. Uma plântula típica para execução dos ensaios visando avaliação dos efeitos do alumínio tóxico é apresentada na Figura 1, seção B.

Os ensaios preliminares de exposição de plântulas a níveis crescentes de alumínio tóxico (próximos aos que ocorrem nos solos brasileiros) mostraram efeitos aparentemente em proporção ao nível de alumínio tóxico existente, no terceiro dia do ensaio, ocorrendo, invariavelmente, morte das plântulas expostas ao maior nível de alumínio no sexto dia de exposição contínua a esse estresse. Um resultado visual típico desses ensaios é mostrado na Figura 1, seção C.

Os efeitos do alumínio tóxico sobre as plântulas de "Brachiaria", embora marcantes, apresentaram progressão mais lenta do que aqueles verificados com outras gramíneas, tal como o arroz (Ferreira et al., 1995). Esse contraste deve-se possivelmente às diferenças de maturidade fisiológica dos tecidos, visto que as respostas mais rápidas ao alumínio têm sido verificadas em plântulas propagadas por sementes.

Cumpram também registrar que ensaios posteriores, realizados com outros genótipos do programa de

melhoramento genético da Embrapa Gado de Corte, resultaram nas mesmas constatações relatadas no presente estudo. A dificuldade na manutenção do nível adequado de pH ao longo de cada ensaio pode ter contribuído para essa ausência inicial de comportamento diferencial entre genótipos. De fato, os sucessivos choques, causados pela repentina acidificação do meio a cada correção, certamente impediram as plântulas de iniciarem mecanismos de reajuste metabólico, os quais seriam esperados caso o pH estivesse permanentemente abaixo do limiar de ativação da toxidez do alumínio. Esse aspecto deverá ser subseqüentemente trabalhado, visando aprimorar o nível de detecção das respostas das plântulas. Por outro lado, a possibilidade da base genética para resistência à toxidez por alumínio ser estreita nos híbridos em estudo não pode ser descartada. Verificações dessa ordem têm sido recentemente constatadas em outras gramíneas, tal como a cevada brasileira (Minella e Sorrells, 2002).

CONCLUSÕES

O cultivo "in vitro" de explantes de meristemas axilares de "Brachiaria", com adição de ácido indolbutírico ao substrato, permitiu a produção eficaz de plântulas miniaturizadas.

As plântulas produzidas mostraram-se adequadas ao estudo de toxidez por alumínio em solução nutritiva, mas a detecção de diferenças entre genótipos contrastantes possivelmente dependerá de novos aperfeiçoamentos na técnica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FERREIRA, R. de P.; CRUZ, C.D.; SEDIYAMA, C.S.; FAGERIA, N.K. Identificação de cultivares de arroz tolerantes à toxidez de alumínio por técnica multivariada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.30, p.789-795, 1995.
2. MINELLA, E.; SORRELLS, M.E. Genetic analysis of aluminum tolerance in Brazilian barleys. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, p.1099-1103, 2002.
3. PASSOS, L.P. **Métodos analíticos e laboratoriais em fisiologia vegetal**. Coronel Pacheco: Embrapa-CNPGL, 1996. p.101-105.
4. VALLE, C.B. do. Genetic resources for tropical areas: achievements and perspectives. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, XIX, São Pedro, 2001. **Proceedings...** São Pedro: SBZ, 2001. p.477-482.
5. VIDIGAL, M.C.; PASSOS, L.P.; SILVA, J.L.O da. Conservação "in vitro" do germoplasma de capim-elefante por meio da micropropagação de meristemas axilares. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.28, p.379-385, 1998.

Tabela 1. Características de plântulas de “Brachiaria” do genótipo CBV-22 regeneradas “in vitro”, em resposta a três meios de cultivo¹.

Meio de Cultivo	Comprimento da parte aérea (cm)	Comprimento da raiz (cm)	Oxidação (%)
BA	9,8 A	7,0 A	21,7 B
BN	7,3 B	6,2 AB	22,5 B
BAN	8,1 AB	5,2 B	43,7 A

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Para a análise de variância, os dados de oxidação foram transformados em v%.

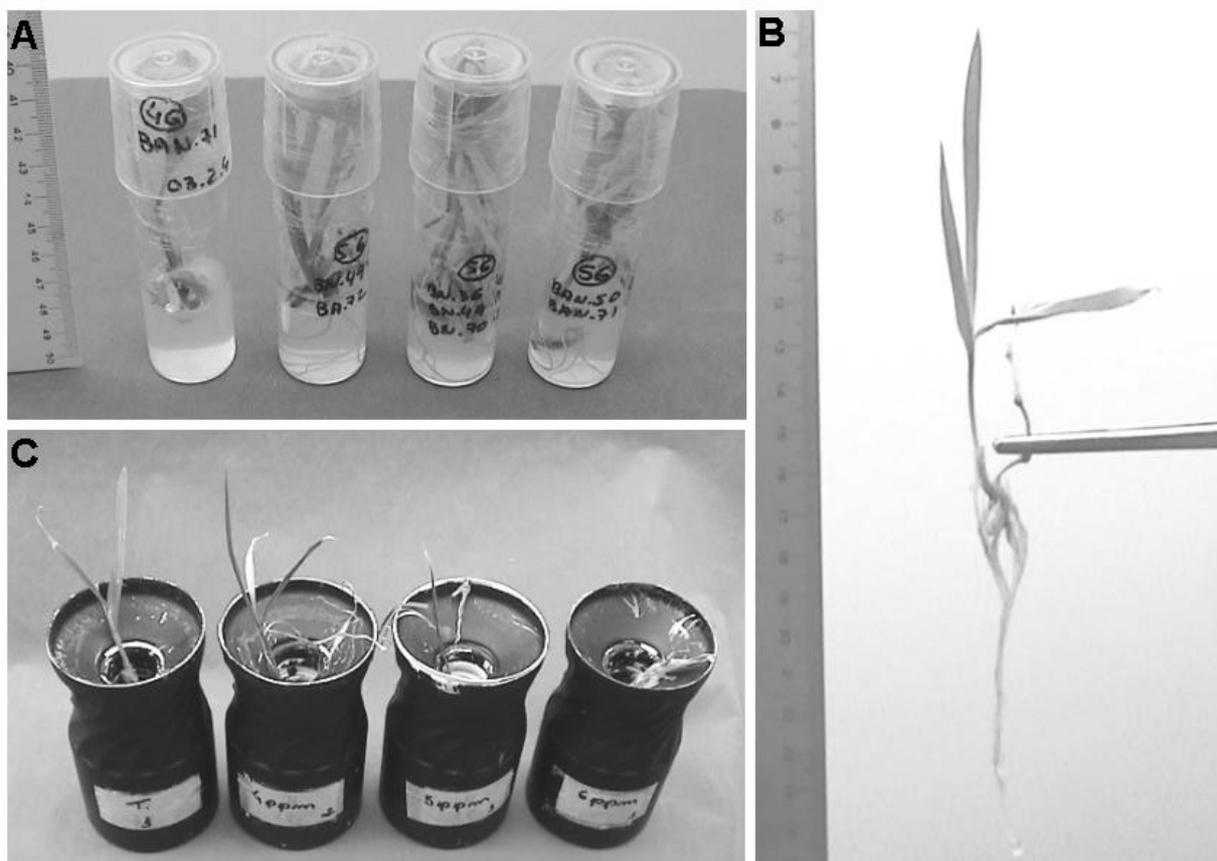


Figura 1. Aspectos representativos do cultivo miniaturizado de “Brachiaria” na avaliação de toxidez por alumínio: (A) Plântulas “in vitro” em estágio de transferência para solução nutritiva; (B) Plântula típica de “Brachiaria” para o início dos estudos; e (C) Estado das plântulas após seis dias de exposição a, respectivamente, 0 (testemunha), 4, 5, e 6 mg/L (ppm) de alumínio.