

**OBTENÇÃO DE PROTOPLASTOS
DE HÍBRIDOS TRIPLÓIDES
ENTRE O CAPIM-ELEFANTE E O MILHETO**

ANA LUIZA DE OLIVEIRA TIMBÓ

2007

ANA LUIZA DE OLIVEIRA TIMBÓ

**OBTENÇÃO DE PROTOPLASTOS
DE HÍBRIDOS TRIPLÓIDES
ENTRE O CAPIM-ELEFANTE E O MILHETO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Prof^a. Dr^a. Lisete Chamma Davide

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

ANA LUIZA DE OLIVIERA TIMBÓ

**OBTENÇÃO DE PROTOPLASTOS
DE HÍBRIDOS TRIPLÓIDES
ENTRE O CAPIM-ELEFANTE E MILHETO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 31 de julho de 2007.

Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto

UFLA

Dr. Antônio Vander Pereira

EMBRAPA - CNPGL

Prof^a. Dr^a. Lisete Chamma Davide

UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Timbó, Ana Luiza de Oliveira.

Obtenção de protoplastos de híbridos triplóides entre o capim-elefante e o milho / Ana Luiza de Oliveira Timbó. -- Lavras : UFLA, 2007.

44 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2007.

Orientador: Lisete Chamma Davide.

Bibliografia.

1. Protoplasto. 2. Capim-elefante. 3. Milho. 4. Híbridos triplóides. 5. Germinação. 6. Cultura de tecidos. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-574.0724

Às minhas avós,

Mariana Martins Timbó e
Maria dos Prazeres Ferreira de Oliveira,

OFEREÇO

Aos meus pais, João Clécio e Luiza Alice, pelo apoio incondicional.
Aos meus irmãos, João Lucas e João Paulo, pelo exemplo de determinação.
Aos meus tios, Augusto, Conceição e Clivoneide, pelo incentivo à pesquisa.
Ao meu namorado, Dheyne, pelo exemplo de coragem e amor.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela forte presença em todas as etapas superadas e concretizadas de minha vida.

À Universidade Federal de Lavras, por meio do Departamento de Biologia, pela oportunidade de realização do Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores Carlucio Roberto Alves, Francisco Átila de Lira Gondim, ao técnico Wellington Veras e amigos, Maria Gardenny Pimenta Ribeiro e Marcelo Rodrigues Tenório, pela iniciação na atividade científica.

Aos pesquisadores Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho, Maurício Reginaldo Alves dos Santos, Waldelice Oliveira de Paiva, Maria Conceição Ferreira de Oliveira e João Paulo Saraiva Morais, pelos ensinamentos, pelo exemplo de amor à pesquisa, pelo incentivo e apoio inicial para a realização deste mestrado.

Aos professores José Eduardo Brasil Pereira Pinto e Lisete Chamma Davide, pela orientação, amizade, compreensão, apoio, confiança e incentivos para a realização deste trabalho, além dos conhecimentos transmitidos para meu crescimento profissional.

Ao pesquisador Antônio Vander Pereira, pela co-orientação, pelo entusiasmo e pela disponibilidade para a realização deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Biologia, pelos ensinamentos teóricos e práticos transmitidos ao longo de todo o curso.

Aos funcionários do Departamento de Biologia, em especial a Elaine, pela eficiência, disponibilidade e alegria.

Ao meu amigo e excepcional laboratorista Evaldo Arantes de Souza, pelo entusiasmo e apoio expressivo na condução dos experimentos.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e Plantas Medicinais: Ricardo, Érika, Louise, Luciana, Rose, Ismayllen, Douglas e Patrícia, por terem me recebido muito bem no laboratório.

Aos amigos do Laboratório de Citogenética: Caio (Mafezoli), Fernanda, Rose, Saulo, Juliane, Letícia, Jeane, Cristiane, Kátia, Leonardo, Amanda, Rafael e Soraya, pela amizade e pelos bons momentos.

Ao Dr. Prof. Wagner Campos Otoni, pela disponibilidade de estágio, pela simpatia e pela transmissão de conhecimentos práticos valiosíssimos.

Aos amigos José Marcelo, Rairys e Jessé, pelo apoio inicial neste trabalho e a Lucélia, Patrícia, Izamara e Dheyne, pelas sugestões dadas na elaboração final.

Aos colegas que entraram comigo no mestrado: Quélen, Larissa, Graciele e Diego, pelos estudos em grupo, pelas comemorações de aniversário e, principalmente, pela amizade, que será eterna.

À coordenação do GEN: Livia, Francine, Quélen, Flavinha, Letícia Paula, Dheyne, Alex e Adriano, pela dedicação, pelo senso de equipe e doação de tempo em prol de melhorias para os estudantes.

Aos amigos Gabriela, Juliana, Ludmila, Diogo, Raoni, Aretusa, Carla, Cida, Paulo Brasil e Paulo Pierre.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional, bem como para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Origem e classificação botânica do capim-elefante e milheto.....	3
2.2 Uso e potencialidades do capim-elefante.....	5
2.3 Melhoramento genético do capim-elefante e obtenção de híbridos interespecíficos.....	7
2.4 A cultura de tecidos de plantas como ferramenta para a duplicação cromossômica.....	10
2.4.1 Material vegetativo para a obtenção de protoplastos.....	12
2.4.1.1 Germinação de sementes <i>in vitro</i>	13
2.4.1.2 Indução e cultivo de calos.....	14
2.4.2 Obtenção de protoplastos.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Material genético.....	20
3.2 Germinação de sementes <i>in vitro</i> e crescimento das plântulas.....	21
3.3 Obtenção de calos através de explantes basais.....	22
3.4. Isolamento de protoplastos de híbridos triplóides.....	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	26
4.1 Germinação de sementes <i>in vitro</i> e crescimento das plântulas	26
4.2 Obtenção de protoplastos de híbridos triplóides.....	30
5 CONCLUSÕES.....	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

RESUMO

TIMBÓ, Ana Luiza de Oliveira. **Obtenção de protoplastos de híbridos triplóides entre o capim-elefante e milho.** 2007. 44 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Buscando gerar maior variabilidade que resulte em avanços na obtenção de cultivares superiores, os programas de melhoramento genético do capim-elefante ($2n = 4x = 28$) realizam o cruzamento desta espécie com o milho ($2n = 2x = 14$). Entretanto, o híbrido triplóide ($3x$) resultante é infértil, impossibilitando sua utilização nesses. A restauração da fertilidade pode ser conseguida pela duplicação cromossômica, utilizando-se antimitóticos. Porém, esse processo de duplicação tem resultado na obtenção de plantas na maioria mixoplóides e poucas hexaplóides estáveis. Devido a essa dificuldade, este trabalho teve por objetivo estudar a germinação de sementes *in vitro* e a obtenção de protoplastos dos híbridos triplóides como base para futuros trabalhos de duplicação cromossômica via fusão de protoplastos e subsequente regeneração de híbridos hexaplóides estáveis. No experimento de germinação *in vitro*, o meio de cultura utilizado constituiu-se do MS com (1, 1/2 e 1/4) das concentrações de sais, acrescidos de sacarose (1,5% e 3%). Avaliou-se, aos 15 dias, a porcentagem de sementes germinadas e, aos 30 dias, o crescimento e desenvolvimento das plântulas *in vitro*. Para o experimento de obtenção de protoplastos, foram utilizados explantes de mesofilo de plantas cultivadas *in vitro* e *in vivo*, ou de calos de híbridos triplóides. Após a assepsia das folhas *in vivo*, as mesmas foram seccionadas transversalmente, em tiras de 1 a 1,5 mm de largura e transferidas para placas de Petri de 90 x 15 mm, contendo 15 mL de meio CPW + 13% manitol. Após a pré-plasmólise soluções enzimáticas em diferentes concentrações da enzima celulase R-10 (0,5%; 1,0%; 1,5%; 2,0%), acrescidas de 0,2% macerozyme e 0,1% driselase ou 1,0% pectolyase Y-23 e 0,5% hemicelulase. A digestão enzimática foi monitorada durante 5 horas, no escuro, sob agitação de 40 rpm, a $26 \pm 2^\circ\text{C}$. O meio mais eficiente para a germinação e o crescimento das plântulas *in vitro* do híbrido foi aquele com a metade dos sais do MS acrescido de 3% de sacarose. Obtiveram-se protoplastos a partir de folhas *in vitro* e *in vivo* de híbridos triplóides entre o capim-elefante e o milho, sendo as folhas *in vitro* as melhores fontes de explante quando digeridas pela solução enzimática 2, por cinco horas, para o híbrido H2 e em três horas de digestão, pela solução enzimática 5, para o híbrido H3.

*Comitê orientador: Lisete Chamma Davide – UFLA (Orientadora), José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA e Antônio Vander Pereira – Embrapa Gado de Leite.

ABSTRACT

TIMBÓ, Ana Luiza de Oliveira. **Protoplasts production from Napier grass and pearl millet triploid hybrids**. 2007. 44 p. Dissertation (Master Program in Genetics and Plant Breeding) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

Searching to generate variability that results in advances in the development of superior cultivars the genetic improvement programs accomplish crosses between Napier grass ($2n = 4x = 28$) and pearl millet ($2n = 2x = 14$). However, the triploid hybrid ($3x$) is infertile, disabling its use in genetic improvement programs. Fertility recovery can be obtained by chromosome duplication, using anti-mitotics. However, this methodology generates many mixoploids and few stable hexaploids. Due to this difficulty, this work aimed to study *in vitro* seed germination and protoplasts production of triploid hybrids as base to future works of chromosome duplication via protoplast fusion and subsequent regeneration of hexaploid hybrids. Seeds were germinated *in vitro* using full-strength, 1/2 and 1/4 MS-salts supplemented with sucrose (1.5% and 3%). The percentage of germination was evaluated after 15 days and *in vitro* plantlet growth and development after 30 days. For protoplasts production *in vitro* and *in vivo* plant mesophylls were used or triploid hybrids callus. After explant surface disinfection, leaves were transversally cut in strips of 1-1.5 mm wide, and transferred to 90 x 15 mm petri dishes containing 15 mL of CPW medium + 13% mannitol. After the pre-plasmolise, enzymatic solutions were tested in different concentrations of cellulase R-10 enzyme (0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%), and added 0.2% macerozyme and 0.1% driselase or 1.0% pectolyase Y-23 and 0.5% hemicelulase. The enzymatic digestion was monitored every hour for a 5 h period, in the dark, under 40 rpm shaking at $26 \pm 2^\circ\text{C}$. The most efficient culture medium for *in vitro* germination and seedling growth was half-strength MS-salts supplemented with 3% sucrose. Protoplasts were obtained from *in vitro* and *in vivo* leaves of triploid hybrids (Napier grass x pearl millet) but the *in vitro* leaves were the best source of explants, when digested with enzymatic solution 2 for five hours for the H2 hybrid. For the H3 hybrid three hours digestion with enzymatic solution 5 was the most efficient.

* Guidance committee: Lisete Chamma Davide - UFLA (Major Professor), José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA and Antônio Vander Pereira - Embrapa Gado de Leite.

1 INTRODUÇÃO

O capim-elefante é uma forrageira tropical de grande importância para a alimentação animal em sistemas de produção de leite, podendo também ser utilizada na fabricação de carvão vegetal, bioóleo, biogás e eletricidade, bem como no controle de erosão em áreas degradadas.

O desenvolvimento de cultivares propagadas por sementes, adaptadas ao sistema de pastejo, apresentando resistência à cigarrinha-das-pastagens e tolerância aos solos de baixa fertilidade, tem sido apontado como a principal demanda dos programas de melhoramento do capim-elefante. Assim, com o objetivo de ampliar variabilidade que resulte em avanços na obtenção de cultivares superiores, esses programas têm recorrido ao cruzamento dessa espécie com o milheto (Pereira et al., 2001).

No entanto, sendo o capim-elefante alotetraplóide ($2n=4x=28$, genoma A'A'BB) e o milheto diplóide ($2n=2x=14$, genoma AA), a hibridação entre essas espécies produz um híbrido triplóide com $2n=3x=21$ cromossomos, genomas AA'B e estéril.

Embora esses híbridos possam ser mantidos por propagação vegetativa, torna-se necessária a restauração da fertilidade do híbrido para que os mesmos voltem ao programa de melhoramento genético, transferindo alelos de características desejáveis para a forrageira.

Para a restauração da fertilidade de híbridos triplóides, têm sido utilizados agentes antimitóticos, como a colchicina, para induzir a duplicação cromossômica. No entanto, esse método não tem se mostrado eficiente para a obtenção em larga escala de híbridos hexaplóides estáveis, sendo necessário investir em novas metodologias.

Já na duplicação cromossômica por meio de fusão de protoplastos, este problema de mixoploidia pode ser minimizado, pois uma única célula duplicada dará origem a uma planta inteira, a partir da regeneração. Uma outra vantagem é que, depois que todo o protocolo esteja otimizado, pode haver uma produção em massa dos híbridos.

O desenvolvimento de metodologia para a obtenção de protoplastos de híbridos triplóides entre o capim-elefante e o milho constitui uma etapa importante, pois servirá como base para futuros trabalhos de fusão de protoplastos, visando à duplicação cromossômica do híbrido. Além disso, os protoplastos constituem excelente material para estudos de eliminação cromossômica, que normalmente ocorre nos híbridos de capim-elefante e milho, após a duplicação.

O objetivo da realização deste trabalho foi a obtenção de protoplastos de híbridos triplóides entre o capim-elefante e o milho.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Origem, distribuição e classificação botânica do capim-elefante e do milheto

O capim-elefante tem seu centro de origem e diversidade na África Tropical, onde ocorre naturalmente em vários países, desde Guiné, no oeste, até Moçambique e Quênia, no leste africano (Brunken, 1977). Nessas regiões, a espécie cresce bem entre as latitudes de 10° Norte e 20° Sul, em altitudes variando do nível do mar até 2.200 m, temperaturas médias de 18°C a 30°C e precipitações de 800 mm a 4.000 mm anuais (Rodrigues et al., 1975, citados por Reis, 2005).

Seu descobrimento e divulgação como planta forrageira foram realizados pelo coronel Napier Springer, que o recomendou ao Departamento de Agricultura da Rodésia (atual Zimbábue), onde foi avaliado com sucesso por volta de 1910, perpetuando, em uma das variedades, o nome 'Napier' (Maldonado, 1955).

O capim-elefante foi, inicialmente, introduzido nos Estados Unidos, pelo Departamento de Agricultura, em 1913 (Jauhar, 1981). No Brasil, foram relatadas duas introduções. Uma no Rio Grande do Sul, com estacas trazidas dos Estados Unidos, em 1920, e outra em 1921, oriunda de Cuba, no estado de São Paulo (Farias, 1994). Hoje, essa gramínea é cultivada em todo território nacional.

As mais importantes cultivares de capim-elefante, como 'Napier', 'Cameroon', 'Mercker' e 'Roxo', foram obtidas por meio da introdução de tipos superiores encontrados nas áreas de diversidade do continente africano (Pereira et al., 2001).

O capim-elefante é cultivado na maioria das regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo conhecido por diversos nomes, tais como capim napier, pasto-gigante, capim-cana africana, entre outros (Pereira et al., 2001).

A espécie *Pennisetum purpureum* pertence à família Poaceae, subfamília Panicoideae, tribo Paniceae, gênero *Pennisetum* L. Rich e seção Penicillaris. É uma das espécies mais conhecidas e de maior importância econômica do gênero. A tribo Paniceae reúne os mais importantes gêneros de plantas forrageiras tropicais, como *Brachiaria*, *Panicum*, *Melinis*, *Setaria*, *Axonopus* e *Acroceras*.

Assim como o capim-elefante, o milheto pertence à família Poaceae, subfamília Panicoidea e gênero *Pennisetum*, sendo comumente denominado de pasto italiano, capim-charuto e tifóide.

Os primeiros cultivos do milheto foram realizados no norte e no oeste da África. Essa espécie foi domesticada como cereal, no sul do Sahara, há aproximadamente 4.000 a 5.000 anos. Hoje em dia, a espécie está distribuída nas áreas tropicais semi-áridas da África e da Ásia (Munson, 1975, citados por Diz, 1994). Já na Índia, além de fazer parte da alimentação humana, começou a ser pesquisado e melhorado como forragem para gado, o que o levou a conquistar espaço como “pastagem de seca” também nos Estados Unidos.

Os primeiros relatos no Brasil indicam a presença do milheto no Rio Grande do Sul, mais especificamente na Estação Zootécnica de Montenegro e datam de 1929, tendo sido avaliado por Anacreonte A. de Araújo (Medeiros, 1977). A avaliação sistemática teve início nos anos 1970, com a introdução de diversos materiais do estado norte-americano da Geórgia. Outro local significativo da pesquisa com milheto foi Pernambuco, no Instituto de Pesquisa Agropecuária (IPA) e na Universidade Federal de Pernambuco (Bonamigo, 1999).

2.2 Usos e potencialidades do capim-elefante

O capim-elefante é largamente utilizado na pecuária, para alimentação de bovinos, ovinos e caprinos. Apresenta também grande potencial para uso energético na fabricação de carvão vegetal, bioóleo, biogás, energia elétrica em usinas termoelétricas e em propriedades rurais. Ainda, cultivares de porte baixo e cor roxa podem ser utilizadas em paisagismo (Fernandes, 2000; Pereira et al., 2001 e Gómez, 2002).

A principal utilização do capim-elefante é como forrageira, pois está entre as espécies de maior eficiência fotossintética (Coombes et al., 1973), apresentando alta capacidade de produção e acúmulo de matéria seca de boa qualidade (Otero, 1961; Zuniga et al., 1967). O seu uso mais freqüente é no regime de corte (capineiras), podendo também ser utilizada para ensilagem (Tosi, 1973 e Vilela, 1981) e para pastejo rotativo (Veiga, 1985a,b e Hilleshein, 1987).

O capim-elefante é uma das forrageiras que mais têm contribuído para a alimentação animal em sistemas de produção de leite. De acordo com Cóser et al. (1999), um hectare de capineira é capaz de produzir forragem para alimentar dez vacas de leite com produção em torno de 6 kg/vaca, exclusivamente com forragem picada.

Desde o início da década de 1980, a Embrapa Gado de Leite estuda a utilização do capim-elefante sob pastejo. Resultados de várias pesquisas têm demonstrado que um hectare de capim-elefante, manejado sob pastejo rotativo e recebendo adubação nitrogenada em dose correspondente a 150-200 kg ha⁻¹.ano de N, pode suportar 4-5 vacas ha⁻¹ ano, com produções de leite no período das chuvas variando de 12-14 kg vaca⁻¹ dia, sem fornecimento de concentrado. Na época da seca, a suplementação com cana-de-açúcar + 1% de uréia, a partir de maio até início de novembro, permite a manutenção da mesma taxa de lotação.

As produções de leite nesse período variam de 7-10 kg vaca⁻¹ dia, dependendo do fornecimento de concentrado. De acordo com vários autores, o manejo intensivo do capim-elefante sob pastejo rotativo tem potencial para atingir produção anual de leite de até 20.000 kg ha⁻¹ (Deresz et al., 1994; Cruz Filho et al., 1996 e Carvalho et al., 2001).

A viabilidade da utilização do capim-elefante como matéria-prima para a produção de energia tem sido estudada pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT). De acordo com Fernandes (2000), é economicamente viável a geração de energia elétrica por gaseificação de biomassa. Gómez (2002) observou que a melhora no desenvolvimento dos processos físico-químicos possibilitou um aproveitamento da ordem de 60% a 65% da biomassa seca do capim-elefante para a produção de bioóleo, além de produzir o gás e o carvão vegetal, que são utilizados na geração de energia que será necessária nesses processos.

A produção de carvão a partir do capim-elefante apresenta potencial para substituir parte do carvão mineral utilizado por siderúrgicas. Assim, o Brasil poderia entrar no mercado europeu de ferro, já que atualmente a Europa não aceita o ferro brasileiro. Isso porque, no processo de aquecimento para a transformação do ferro bruto em pelotas de ferro, há a utilização do carvão mineral que, ao contrário do carvão vegetal, é uma fonte de energia não renovável (Gómez, 2002).

O capim-elefante destaca-se também pela capacidade de fixação de até 12,6 t ha⁻¹ ano de carbono. Além do ganho para a natureza, os produtores poderão conduzir projetos de mecanismo de desenvolvimento limpo (MDL) e se beneficiar do “mercado de *commodities* de carbono”, vendendo créditos de carbono para os países desenvolvidos, como prevê o Protocolo de Kyoto. Cada tonelada de carbono no mercado global é avaliada em torno de US\$ 5,00

(Gómez, 2002). Isso mostra o grande potencial do capim-elefante no cenário da agroenergia e no mercado de carbono.

2.3 Melhoramento genético do capim-elefante e obtenção de híbridos interespecíficos

A contribuição do melhoramento de plantas para as forrageiras tropicais pode ser considerada muito pequena, quando se compara com avanços obtidos para espécies como milho e soja. A principal demanda que os programas de melhoramento do capim-elefante precisam atender é o desenvolvimento de cultivares com propagação por meio de sementes, adaptadas ao sistema de pastejo, com resistência à cigarrinha-das-pastagens e a solos de baixa fertilidade (Pereira et al., 2001).

No Brasil, mesmo sendo cultivado em todo o território nacional, o capim-elefante carece de cultivares adaptadas as diferentes condições edafoclimáticas e sistemas de utilização, devido à existência de poucos programas de melhoramento (Pereira et al., 2001).

Buscando obter novas combinações gênicas para atender à demanda nacional por cultivares forrageiras superiores, a Embrapa Gado de Leite, em 1991, iniciou um programa de melhoramento genético do capim-elefante, com objetivo de obter cultivares que apresentem maior velocidade de crescimento, maior produtividade, melhor qualidade forrageira, maior eficiência na utilização de nutrientes, distribuição mais equitativa da produção de matéria seca durante o ano, elevada produção de sementes viáveis para a propagação via sementes, tolerância à seca e resistência ao pisoteio, pragas e doenças (Pereira, 1994).

O melhoramento da maioria das características de importância forrageira do capim-elefante pode ser conseguido por meio da exploração da variabilidade existente na própria espécie. No entanto, considerando a capacidade do capim-

elefante de trocar alelos com outras espécies de *Pennisetum*, o programa de melhoramento pode recorrer à utilização de germoplasma de espécies pertencentes a conjuntos gênicos próximos, como o milheto (Pereira et al., 2001). Esse tipo de combinação genética busca reunir no híbrido algumas características desejáveis do milheto, como vigor, resistência à seca, tolerância a doenças, qualidade forrageira e tamanho das sementes, enquanto que rusticidade, agressividade, perenidade, boa palatabilidade e elevada produtividade de matéria seca são conferidas pelo capim-elefante (Diz, 1994 e Jauhar & Hanna, 1998).

Segundo Jauhar (1981) a forragem do híbrido entre essas duas espécies apresenta melhor aceitação pelos bovinos que o próprio capim-elefante. Esses híbridos têm apresentado grande variabilidade para caracteres de importância forrageira, já tendo sido selecionados genótipos com 23% de proteína bruta nas folhas, valor esse superior à média de 16% encontrada no capim-elefante (Pereira et al., 2000).

No entanto, essas duas espécies apresentam níveis de ploidia diferentes, pois o capim-elefante ($2n=4x=28$) é alotetraplóide e o milheto ($2n=2x=14$) é diplóide. A hibridação entre ambas as espécies produz um híbrido triplóide com $2n = 3x = 21$ cromossomos e genomas AA'B infértil. A principal causa da esterilidade do híbrido triplóide é o número de cromossomos não balanceado. Essa infertilidade do híbrido é a principal barreira nos programas de melhoramento, pois impede sua utilização em cruzamentos e sua propagação por sementes (Paiva, 2006).

A duplicação cromossômica dos triplóides restaura a fertilidade do híbrido, produzindo plantas hexaplóides com sementes viáveis e maiores que as do capim-elefante.

Diante disso, torna-se indispensável à restauração de fertilidade do híbrido triplóide que permitirá o desenvolvimento de cultivares melhoradas.

Segundo Pereira et al. (2001), o plantio por meio de sementes apresenta vantagens sobre a propagação vegetativa, tendo em vista a facilidade de armazenamento, transporte e plantio mecanizado, resultando em menor custo de implantação de novas áreas com essa forrageira.

Por meio da duplicação cromossômica de plantas triplóides, Hanna (1981) e Hanna et al. (1984) produziram híbridos hexaplóides. No entanto, a duplicação não foi averiguada por meio de análise citogenética e, sim, apenas com base na presença de pólen nas panículas. Estudos mais recentes da citonegética de alguns desses híbridos revelam que se tratam de mixoplóides (Paiva, 2006 e Bustamante et al., 2007).

No Brasil, os primeiros trabalhos envolvendo esses híbridos foram realizados em meados da década de 1990, com a introdução dos híbridos hexaplóides provenientes dos Estados Unidos. Alguns trabalhos desenvolvidos nas condições brasileiras confirmaram o excelente potencial produtivo e nutricional dos híbridos hexaplóides (Vilela et al., 1997; 2001; 2002).

Em 2002, a empresa Matsuda lançou, no mercado brasileiro, a primeira cultivar de capim-elefante propagada por sementes, denominada 'Paraíso'. Essa cultivar é um híbrido hexaplóide que, erroneamente, tem sido divulgada como uma nova espécie, *Pennisetum hybridum* (Reis, 2005).

Na Universidade Federal de Lavras (UFLA), trabalhos têm sido desenvolvidos com o objetivo de duplicar os cromossomos de híbridos triplóides por meio do uso de antimitóticos. Após a indução, as plantas são avaliadas quanto ao número cromossômico, conteúdo de DNA, viabilidade do pólen e comportamento meiótico para futuro ingresso no programa de melhoramento do capim-elefante da Embrapa Gado de Leite (Abreu, 2002; Barbosa, 2004 e Campos, et al., 2007).

No entanto, alta frequência de mixoplóides tem sido encontrada entre os híbridos duplicados tanto nos EUA como no Brasil (Paiva, 2006 e Bustamante et al., 2007), indicando a necessidade de se utilizar metodologias mais adequadas.

2.4 A cultura de tecidos de plantas como ferramenta para a duplicação cromossômica.

A cultura de tecidos pode auxiliar a restauração da fertilidade a partir da duplicação cromossômica em híbridos interespecíficos, a qual pode ser conseguida pelo uso de agentes antimitóticos em material *in vitro*, bem como pela fusão de protoplastos do híbrido.

Segundo Barbosa (2004), a utilização de agentes antimitóticos, como a colchicina, apesar da baixa eficiência, apresenta melhores resultados quando conduzidos em condições *in vitro*, comparada com a utilização de plantas *in vivo*. O autor observou que as sementes de híbridos triplóides, entre o capim-elefante e o milheto, cultivadas *in vitro*, apresentaram melhor resposta ao tratamento de indução de poliploidia, em solução de colchicina 0,1%, por 24 horas. Nesse tratamento, três das oito plantas sobreviventes apresentaram o conjunto cromossômico duplicado e a fertilidade confirmada pela presença de pólen viável.

Outros estudos mostraram que, além de haver uma baixa porcentagem de sobrevivência ao tratamento com a colchicina, as poucas plantas hexaplóides acabaram retornando à sua condição triplóide ou resultando em um mixoplóide (Abreu, 2002 e Paiva, 2006). Isso se deve ao fato que, durante o desenvolvimento da planta, algumas células duplicadas eliminam seus cromossomos. Abreu (2002) explica que a eliminação cromossômica somática é um mecanismo que pode levar ao isolamento reprodutivo, podendo ser total ou

parcial, de um dos genomas parentais como consequência da condição híbrida, ou seja, ocorre um desajuste entre os genomas de espécies diferentes.

Uma outra explicação para a baixa taxa de poliplóides estáveis se deve ao fato que a colchicina só age efetivamente nas células que se encontram em divisão. Desse modo, a poliploidização geralmente não atinge todas as células do material tratado, sendo comum o aparecimento de mixoplóides e quimeras. Em consequência, surge o problema relativo à estabilidade da condição poliplóide. É freqüente a reversão parcial ou total da condição diplóide, após alguns ciclos de divisão, principalmente devido à proliferação das células diplóides remanescentes que se multiplicam a taxas superiores àquelas das células poliplóides (Roth, 1984).

Já na duplicação cromossômica por meio de fusão de protoplastos, esse problema de mixoploidia pode ser minimizado, pois uma única célula duplicada dará origem a uma planta inteira, a partir da regeneração. Outra vantagem é que, depois que todo o protocolo esteja otimizado, pode haver uma produção em massa dos híbridos. Vale ressaltar que, muito provavelmente, também poderá haver eliminações cromossômicas.

Existem na literatura, muitos protocolos, já otimizados, para isolamento e cultivo de protoplasto, além da regeneração de plantas maduras de diversas espécies. Mas, o objetivo principal desses protocolos é servir de base para subseqüentes trabalhos de hibridização somática de espécies que não se cruzam naturalmente (Oliveira et al., 1995; Mizuhiro et al., 2001; Prasertsongskun, 2004; Trabelsi et al, 2005 e Assani et al, 2006). E, em outros trabalhos, os objetivos são a recombinação citoplasmática, a transferência de genes, além de estudos básicos como o transporte de membrana, a regulação metabólica e a expressão gênica (Anthony et al., 1999).

Nesse contexto, a regeneração de plantas duplicadas pode ocorrer devido às fusões espontâneas de protoplasto que acontecem durante o tratamento

enzimático. Essas plantas são mencionadas no decorrer dos trabalhos iniciais da realização de protocolos para isolamento, cultivo e regeneração de plantas derivadas de protoplasto. Assani et al. (2006), através da análise de ploidia por citometria de fluxo observaram que 4% das plantas regeneradas derivadas de protoplastos de banana tinham os seus cromossomos duplicados, gerando plantas hexaplóides. Os autores explicam que isso pode ser uma consequência da fusão espontânea, fusão de núcleo em divisões rápidas do protoplastos ou na fase de microcalos. A duplicação do nível de ploidia em protoplastos também foi relatada por Ramulu et al. (1989), em seus estudos com plantas derivadas de protoplastos de batata.

Algumas etapas devem ser cumpridas para o sucesso de tais protocolos experimentais, entre elas: o isolamento de protoplastos em grandes quantidades, a avaliação da viabilidade celular, o cultivo dos protoplastos em larga escala, a fusão celular e a regeneração de uma nova planta (Vieira, 1997).

Antes da realização do isolamento dos protoplastos é necessário obter fontes de explantes de boa qualidade fisiológica, o que pode ocorrer por meio da germinação e crescimento de plântulas *in vitro*, assim como a indução e manutenção de calos.

2.4.1 Material vegetativo para a obtenção de protoplastos

Teoricamente, utilizando-se uma mistura adequada de enzimas pectocelulolíticas, pode-se obter protoplasto a partir de qualquer tipo de tecido vegetal. O protoplasto é uma célula vegetal desprovida de parede celular. Este é um estado transitório da célula, obtido em laboratório, que pode ser manipulado, conservando, ainda, a potencialidade de uma célula vegetal completa (Carneiro et al., 1998).

A literatura cita várias fontes que podem ser utilizadas para a obtenção dos protoplastos, tais como folhas, calos e suspensões celulares para as culturas *in vitro* e folhas em cultura *in vivo*. Vários fatores podem afetar a obtenção de protoplastos viáveis, como a espécie, o estado fisiológico da planta, o tipo e a idade do explante, bem como as condições de isolamento (Carneiro & Conroi, 1990). A utilização de calos ou suspensões celulares embriogênicas é de grande interesse, pois, após a obtenção e o plaqueamento dos protoplastos, há uma tendência à formação de embriões, já que as células são embriogênicas. Já os protoplastos oriundos de folhas, primeiro, devem ser estimulados por meio de reguladores de crescimento e meio adequado para que as células adquiram características embriogênicas ou organogênicas.

Como o estado fisiológico da planta e a idade do explante são parâmetros importantes para a obtenção de protoplastos em quantidade e qualidade, é necessário o desenvolvimento de protocolos que forneçam boas fontes *in vitro* do híbrido triplóide entre o capim-elefante e o milho.

2.4.1.1 Germinação de sementes *in vitro*

A germinação é um fenômeno biológico que pode ser considerado botanicamente, como a retomada do crescimento do embrião, com o conseqüente rompimento do tegumento pela radícula (Labouriau, 1983). Germinação pode também ser definida como o início do desenvolvimento de um novo indivíduo vegetal a partir de uma semente colocada sob condições favoráveis (Larousse, 1998), dando origem a uma plântula normal (Marcos Filho et al., 1987).

Basicamente, a germinação é composta por três fases: embebição (quando acontece a reativação do metabolismo), indução de crescimento e protusão da radícula. A embebição é um conjunto de processos físicos que

ocorrem em função das propriedades dos colóides e sua dimensão varia com a permeabilidade do tegumento, composição química da semente, da área de contato entre a semente e a água, com a pressão hidrostática e o estado fisiológico da própria semente (Bewley & Black, 1994).

Para que a germinação ocorra, a semente precisa estar com os mecanismos internos (físicos, fisiológicos e bioquímicos) e com as condições externas (água, oxigênio, temperatura e luz) apropriados. Segundo Mayer & Poljakoff-Mayber (1989), o processo de germinação é controlado por fatores intrínsecos e extrínsecos, os quais podem ser representados pela composição química de sementes, seu balanço hormonal e fatores ambientais.

Passos & Katterman (1994), estudaram os efeitos de duração de assepsia (5', 10' e 15') sobre a percentagem de sementes germinadas das cultivares Napier, Taiwan A-26 e Taiwan A-144, monitoradas aos 5, 10 e 15 dias após a inoculação em meio MS, com 0,8% de ágar acrescido de 1% de sacarose e sem reguladores de crescimento. A taxa de germinação não foi afetada nas cultivares Taiwan A-26 e Taiwan A-144. O ganho em altura de plântulas das cultivares Napier e Taiwan A-26 foi mais pronunciado com esterilização de 15', enquanto que, para a 'Taiwan A-144', isso ocorreu com o tratamento de cinco minutos.

A germinação de sementes *in vitro* tem sido utilizada para a obtenção de plântulas assépticas como fonte de explantes, dentre outras aplicações, dispensando os procedimentos de assepsia (Danieli & Glória, 1998). Outra grande vantagem do uso de sementes é a obtenção de explantes jovens favorecendo a multiplicação e a formação de calos para o cultivo em meios nutritivos contendo reguladores de crescimento (Rosal, 2004).

2.4.1.2 Indução e cultivo de calos

Segundo Torres et al. (2000), o calo pode ser definido como um grupo ou massa de células com crescimento desordenado, as quais podem apresentar certo grau de diferenciação. O calo é uma resposta comum quando um tecido *in vitro* passa por injúrias físicas ou químicas, podendo se diferenciar em órgãos ou tecidos.

A indução de calos pode ocorrer, praticamente, em qualquer parte da planta (explante), entretanto, tecidos e órgãos contendo células não diferenciadas, como as que ocorrem em regiões meristemáticas, são mais adequadas (Handro & Floh, 1990).

Na indução de calogênese em capim-elefante são utilizados, como fonte de explante: folhas, raízes e anteras (Haydu & Vasil, 1981 e Passos & Katterman, 1994).

Diversas características inerentes aos explantes interferem na calogênese, como o seu tamanho, a composição do meio de cultura, os reguladores de crescimento e a idade da planta mãe (Murashige, 1974).

Para que a cultura de calos obtenha sucesso, quase sempre é necessária a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura, para suprir possíveis deficiências dos teores de fitohormônio nos explantes. Geralmente, concentrações semelhantes de auxina e citocininas no meio de cultura promovem a formação de calos, mas esse efeito varia em função do balanço hormonal endógeno de cada espécie (Pierik, 1990).

Passos & Kattermain (1994) compararam a indução de calos em raízes e folhas de cinco cultivares de capim-elefante utilizando dois meios de cultivo: 0,5 mg/L de 2,4 D, 0,5 mg/L de BAP, 1,0 mg/L de ANA e 0,01mg/L de cinetina e outro meio com apenas o regulador de crescimento 0,5 mg/L de 2,4 D. Os autores constataram que, utilizando explantes foliares, a indução iniciou-se

quatro dias após a inoculação, em ambos os meios de cultura. Já para as raízes, o início da indução de calos ocorreu apenas entre 15 e 20 dias após a inoculação. Para os calos induzidos de folhas da cultivar Napier, propagada vegetativamente, houve um aumento de 3,3 vezes no peso fresco no período de sete semanas.

Na manutenção da cultura de calos é importante realizar o subcultivo no período apropriado para cada espécie. Passos & Kattermain (1994) realizaram, a cada duas semanas, o subcultivo dos calos induzidos de folhas e raízes para as cinco cultivares de capim-elefante. Os autores explicam que procedimento visa prevenir a redução ou a paralisação do crescimento dos calos, que é causada pela liberação de toxinas no meio de cultura, podendo ser identificada pelo aparecimento da coloração marrom.

Uma vez estabelecida, a cultura de calos é utilizada para uma variedade de experimentos, como, por exemplo, produção de metabólitos secundários, obtenção de protoplastos, seleção celular, embriogênese somática e organogênese (Rosal, 2004).

2.4.2 Obtenção de protoplastos

Como já mencionado, protoplasto é uma célula desprovida de parede celular. A parede celular dos vegetais é constituída basicamente de celulose, hemicelulose e pectina. Dentre essas fibras as de celulose e hemicelulase dão rigidez à parede, enquanto a pectinase mantém juntas as células adjacentes.

Segundo Carneiro et al. (1998), embora os constituintes básicos sejam os mesmos, a composição da parede celular varia muito entre as espécies e os diferentes tecidos da mesma planta, o que requer a definição de um sistema específico para a digestão da parede. No processo de obtenção de protoplastos, a seleção das enzimas e a adequação de suas concentrações são muito importantes para se obter uma quantidade elevada de protoplastos viáveis. Além disso,

interferem nesse processo, o estado fisiológico da planta, a pressão osmótica e a composição do meio de digestão.

As enzimas, tais como as pectocelulolíticas, foram usadas, a princípio, na indústria, para a produção de sucos de frutas. Elas são isoladas de microrganismos simbióticos, parasitas ou saprofiticos que degradam naturalmente a parede celular (Carneiro et al., 1998).

As mais usadas são: a celulase Onozuka R10, extraída de *Trichoderma viride*, que possui duas importantes atividades celulolíticas, descristalização de cadeias e despolimerização da celulose; a pectinase Macerozyme R 10, isolada de *Rhizopus sp.*, que tem uma importante atividade endo-poligalacturonase, desdobrando, assim, a pectina; a celulase driselase, do fungo *Irpex lacteus*, que possui atividades pectinolítica e celulolítica. Pode-se, ainda, citar Cellulysin, a hemicelulase *Rhozyme* e a pectinase Pectolyase Y23, entre outras preparações comerciais utilizadas (Carneiro et al., 1998).

Num trabalho inicial, Takebe et al. (1968) isolaram protoplastos de fumo em duas etapas de digestão. Primeiramente, as células foram submetidas à digestão com Macerozyme, que separa as células, já em última etapa, utilizaram a celulase e a pectinase para finalizar o processo de digestão (Power & Cocking, 1970). Atualmente, na maioria dos trabalhos publicados, essa técnica é realizada em uma única etapa (Shiba & Mii, 2005; Trabelsi et al., 2005 e Assani et al., 2006).

Uchimiya & Murashige (1974) verificaram que 0,2% (p/v) de Macerozyme é a concentração ótima, em combinação com 1% (p/v) de Celulase Onozuka R10, para se obter protoplastos de cultura de células de fumo. Já no feijão (*Phaseolus vulgaris*) são obtidos protoplastos de mesofilo utilizando-se as seguintes enzimas: celulase 0,2%, driselase 0,05% e macerozyme 0,02% (Crepy et al., 1986). Para a obtenção de protoplastos de células de cenoura em

suspensão, foram utilizadas celulase 0,5%, driselase 0,25%, macerozyme 1% e pectoliase 0,05%.

Vasil et al. (1983) isolaram protoplastos de suspensão celular originadas de calos embriogênicos de inflorescências de capim-elefante, sendo o tratamento 2,5% de celulose R10 o melhor. Os autores observaram que, quando utilizavam a enzima driselase, ocorria uma porcentagem de 90% de fusões espontâneas. Apesar dos autores terem conseguido isolar e cultivar os protoplastos, as plantas regeneradas não atingiram a maturidade.

A degradação enzimática da parede celular se efetua em meio líquido, cuja composição deve seguir algumas regras para facilitar a ação das enzimas e permitir a sobrevivência dos protoplastos que estão sendo liberados no processo. Como essas células ficarão algumas horas no meio de digestão, é necessário que este contenha: os principais componentes do meio de cultura, pH que favoreça a ação enzimática e, principalmente, uma pressão osmótica que dê estabilidade aos protoplastos recém-liberados (Carneiro et al., 1998).

Algumas espécies vegetais, especialmente as monocotiledôneas, contêm fenóis e goma nos tecidos (Ishii, 1989). Quando essas espécies são colocadas no meio de digestão, esses componentes são liberados, diminuindo a viabilidade dos protoplastos. Uma pré-incubação do tecido, durante algumas horas, em meio líquido com sais, pode resolver esse problema. Polivinilpirrolidona (PVP) de 0,5% a 2% no meio de digestão pode ser útil para diminuir os efeitos dos compostos fenólicos (Shepard & Totten, 1977 e Matsumoto et al., 1984).

Na ausência da parede celular, os protoplastos podem se romper se houver difusão de água para o interior das células. Para evitar a ruptura da membrana plasmática, a pressão hidrostática da célula deve ser reduzida ao ponto de uma ligeira plasmólise. Isso é conseguido adicionando-se manitol, sorbitol, sacarose ou outros açúcares, na concentração de 0,3 a 0,8 mol.L⁻¹ (Carneiro et al., 1998).

Após a determinação de uma metodologia de obtenção de protoplastos, os procedimentos seguintes a serem realizados são a purificação e o teste de viabilidade. A purificação é feita para remover as enzimas residuais da digestão, os eventuais grupos de células não digeridas e os fragmentos celulares, podendo ser realizada por métodos de gradiente de densidade, como sacarose, Ficoll e Percoll que, após a centrifugação, separa os protoplastos viáveis em uma das bandas.

Para a determinação da viabilidade de protoplastos obtidos, pode ser utilizado o corante Azul de Evans 0,05% (Kanay & Edwards, 1973) adicionado à amostra após a purificação. Protoplastos intactos excluem o corante, enquanto protoplastos quebrados são permeáveis a ele. Atualmente, o diacetato de fluoresceína (FDA) é bastante utilizado (Nassour & Dorion, 2002; Kim et al., 2005 e Shiba & Mii, 2005).

Segundo Larkin (1976), o FDA é um composto não-fluorescente e apolar que atravessa a membrana plasmática facilmente. No citoplasma dos protoplastos, as esterases hidrolisam essa substância, liberando a fluoresceína, que é fluorescente e polar, não conseguindo se movimentar com facilidade por meio do plasmalema, indo acumular-se no citoplasma das células vivas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia (DBI) e no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, sendo conduzidos, de forma simultânea, de 2005 a 2007.

3.1 Material genético

Sementes de três cruzamentos entre *Penisetum purpureum* e *Penisetum glaucum* (Tabela 1), obtidos pelo programa de melhoramento do capim-elefante da Embrapa Gado de Leite, Coronel Pacheco, Juiz de Fora, MG, foram utilizadas em testes de germinação e para a obtenção de protoplastos (Tabela 1). Para o teste de germinação foram utilizadas as sementes do híbrido H1, enquanto que, para a obtenção de protoplastos, foram utilizadas as folhas de plântulas cultivadas *in vitro* e *in vivo*, e os calos dos híbridos H2 e H3.

TABELA 1. Combinações híbridas utilizadas nos experimentos. UFLA, Lavras, MG, 2007.

HÍBRIDOS TRIPLÓIDES	CRUZAMENTOS	
	Capim-elefante ♂	Milheto ♀
H1	CNPGL 91-2-5	M62
H2	CNPGL 91-2-5	M42
H3	Merker Pinda	M41

3.2 Germinação de sementes *in vitro* e crescimento das plântulas

Sementes do híbrido H1 foram submetidas à desinfestação com ácido sulfúrico 50% por 15 minutos, recolhidas em peneira e tratadas com solução de álcool 70% (v/v), por 1 minuto. Posteriormente, as sementes foram imersas em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 50% (v/v), durante 15 minutos e, em câmara de fluxo laminar, foram lavadas com água destilada estéril por três vezes. Após serem transferidas para uma placa de Petri com papel de filtro, cada semente foi inoculada em um tubo de ensaio contendo 10 mL de meio de cultivo.

Utilizou-se o meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) em combinações de três concentrações de sais e suplementado com 3% ou 1,5% de sacarose, de acordo com os seguintes tratamentos: T1) 100% dos sais do MS + 3% de sacarose; T2) 50% dos sais do MS + 3% de sacarose; T3) 25% dos sais do MS + 3% de sacarose T4) 100% dos sais do MS + 1,5% de sacarose; T5) 50% dos sais do MS + 1,5 % de sacarose e T6) 25% dos sais do MS + 1,5% de sacarose.

Os meios de cultura foram solidificados com 0,6% de ágar, tendo o pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$ e, em seguida, autoclavado, a 120°C em 1 atm, por 20 minutos.

Após a inoculação das sementes, os tubos de ensaios foram transferidos para uma sala de crescimento sob condições controladas de temperatura $26 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 16 horas e irradiação de $25 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$, proveniente de lâmpadas do tipo fluorescente branca fria.

A avaliação da porcentagem de germinação foi realizada no 15º dia. Foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram protusão da radícula. O experimento foi constituído por seis tratamentos (meios de cultura), com quatro repetições e parcela de oito tubos.

Ao final de 30 dias, foi avaliado o crescimento das plântulas por meio das características parte aérea (comprimento, número de folhas e biomassa seca) e radicular (comprimento, número de raízes e biomassa seca).

O delineamento experimental foi o inteiramente causalizado. As médias foram comparadas pelo Teste Scott & Knott, a 5%.

3.3 Obtenção de calos através de explantes basais

A indução de calos foi realizada com objetivo de produzir fonte de material vegetativo para ser utilizado na obtenção de protoplastos.

Para isso, foram utilizados explantes basais de três centímetros de plântulas dos híbridos H2 e H3, germinadas em tubos contendo 10 mL de meio MS acrescido de 3% de sacarose (Figura 1A). Após 30 dias, os calos induzidos foram transferidos para frascos contendo 30 mL de meio MS acrescido de 2,0 mg L⁻¹ do regulador de crescimento 2,4-D (ácido diclorofenóxiacético). Os frascos foram mantidos em sala de crescimento, a 26 ± 1°C, com fotoperíodo de 16 horas e irradiação de 25 μmol m² s⁻¹, proveniente de lâmpadas do tipo fluorescente branca fria. Para a manutenção da cultura de calos, eles foram subcultivados em novo meio a cada 20 dias, de acordo com Passos & Kattermain (1994).

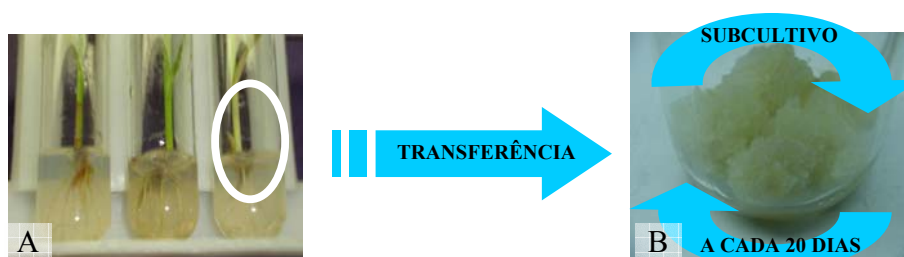


FIGURA 1. Explante basal (A) utilizado na calogênese e a manutenção dos calos do híbrido entre capim-elefante e milho (B). UFLA, Lavras, MG, 2007.

3.4 Obtenção de protoplastos de híbridos triplóides

Para a obtenção de protoplastos foi utilizado mesofilo foliar de plântulas e de calos dos híbridos triplóides H2 e H3.

Os explantes foliares foram retirados de plântulas obtidas a partir de sementes germinadas em substrato “Plantmax” (*in vivo*) e mantidas em casa de vegetação, ou germinadas em cultivo *in vitro*, de acordo com protocolo descrito no item 3.2. Foram utilizados tubos contendo 10 mL do meio MS acrescido de 3% de sacarose. A obtenção de protoplasto foi realizada após 30 dias de cultivo *in vivo* ou *in vitro*.

Para a obtenção de protoplastos, os três tipos de fonte de material vegetativo, mesofilo foliar de plântulas *in vivo* e *in vitro*, bem como de calos, foram submetidos a oito tratamentos com soluções enzimáticas diferentes (Tabela 2).

TABELA 2. Soluções enzimáticas utilizadas para a digestão de mesofilo foliar de plântulas obtidas *in vivo*, *in vitro* e de calos dos híbridos. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Tratamento	SOLUÇÕES ENZIMÁTICAS		
E1	0,5 % Celulase R-10	0,2% Macerozyme	0,1% Driselase
E2	1,0 % Celulase R-10	0,2% Macerozyme	0,1% Driselase
E3	1,5 % Celulase R-10	0,2% Macerozyme	0,1% Driselase
E4	2,0 % Celulase R-10	0,2% Macerozyme	0,1% Driselase
E5	0,5 % Celulase R-10	1,0% Pectinase	0,5% Hemicelulase
E6	1,0 % Celulase R-10	1,0% Pectinase	0,5% Hemicelulase
E7	1,5 % Celulase R-10	1,0% Pectinase	0,5% Hemicelulase
E8	2,0 % Celulase R-10	1,0% Pectinase	0,5% Hemicelulase

As soluções enzimática foram preparadas por diluição em meio CPW ($\text{KH}_2\text{PO}_4 = 27,2 \text{ mg L}^{-1}$; $\text{KNO}_3 = 101 \text{ mg L}^{-1}$; $\text{Ca Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 1480 \text{ mg L}^{-1}$; $\text{Mg SO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O} = 246 \text{ mg L}^{-1}$; $\text{KI} = 0,16 \text{ mg L}^{-1}$ e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} = 0,025 \text{ mg L}^{-1}$) de acordo com Frearson et al. (1973), acrescido de 13% de manitol e, após o ajuste do pH (5,6) com 5 mM do tampão MES, as soluções foram filtro-esterilizadas em membranas de filtro Millipore, com $0,22 \mu\text{m}$ de porosidade.

Em capela de fluxo laminar, os explantes foliares de plantas *in vivo* mantidas em casa de vegetação foram imersos em NaOCl a 2,5% (v/v), por 10 minutos e, posteriormente, em álcool 70% (v/v) por 1 minuto. Em seguida, os mesmos foram lavados por três vezes, com água destilada estéril.

O diagrama das etapas do processo de obtenção de protoplastos, realizadas neste experimento, encontra-se na Figura 2. Em condições assépticas, pesaram-se 500 mg de folhas obtidas *in vivo* e *in vitro*, em tamanhos de 6 cm (Figura 2A e 2B). Essas folhas foram seccionadas em tiras de 1,0 a 1,5 mm e, posteriormente, o material vegetal foi pré-plasmolisado, durante uma hora e na ausência de luz, em 20 mL de meio CPW + 13% de manitol (Figura 2C). Em seguida, a solução de CPW + 13% de manitol foi descartada com o uso de pipetas de Pasteur, sendo, então, adicionados 20 mL da mistura enzimática (Figura 2D e 2E). Cada amostra recebeu diferentes tratamentos enzimáticos.

Para a obtenção dos protoplastos a partir de calos, transferiu-se 1g do material vegetal para uma solução de 10 mL de CPW + 13% manitol, por 1 hora no escuro, para que houvesse a pré-plasmólise. Ao final desse período, foram adicionados 10 mL de solução enzimática concentrada, resultando em um volume final de 20 mL.

A digestão enzimática ocorreu pela incubação dos explantes de folhas e calo, durante 5 horas, no escuro, sob agitação de 40 rpm e temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$. O monitoramento foi realizado a cada hora, sendo retirada uma pequena alíquota de cada placa/tratamento para a quantificação dos protoplastos

em Câmara de Neubauer, sob microscópio ótico. Foi utilizado o corante Azul de Evans a 0,05% para a contagem dos protoplastos viáveis (Figura 2F e 2G), foram considerados viáveis os protoplastos que excluíram o corante.

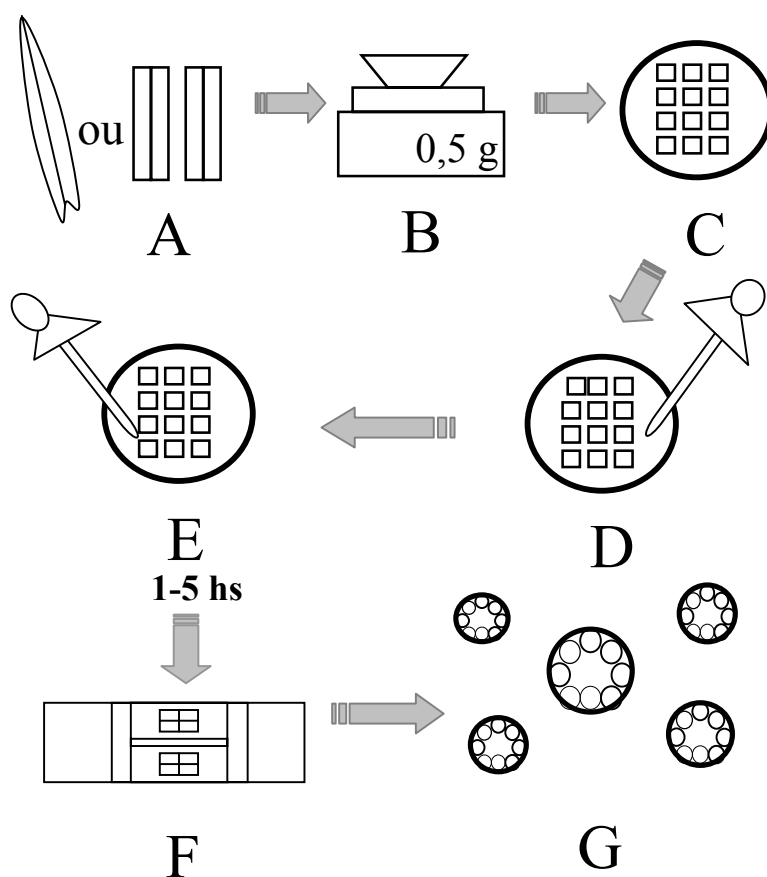


FIGURA 2. Diagrama representativo do procedimento de obtenção de protoplastos de folhas do híbrido triplóide entre o capim-elefante e o milho. (A) Folhas do híbrido. (B) Pesagem das folhas. (C) Corte dos tecidos em tiras de 1 a 1,5 mm e adição do meio CPW + 13% manitol, por 1 hora, no claro (pré-plasmólise). (D) Descarte do meio CPW +13% manitol (E) e adição da solução enzimática. (F) Câmara de Neubauer. (G) Protoplastos. UFLA, Lavras, MG, 2007.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Germinação de sementes *in vitro* e crescimento das plântulas

O teste de germinação de sementes *in vitro* do híbrido H1 possibilitou determinar o meio de cultivo mais adequado para a produção de plântulas assépticas e juvenis utilizadas na obtenção de protoplastos.

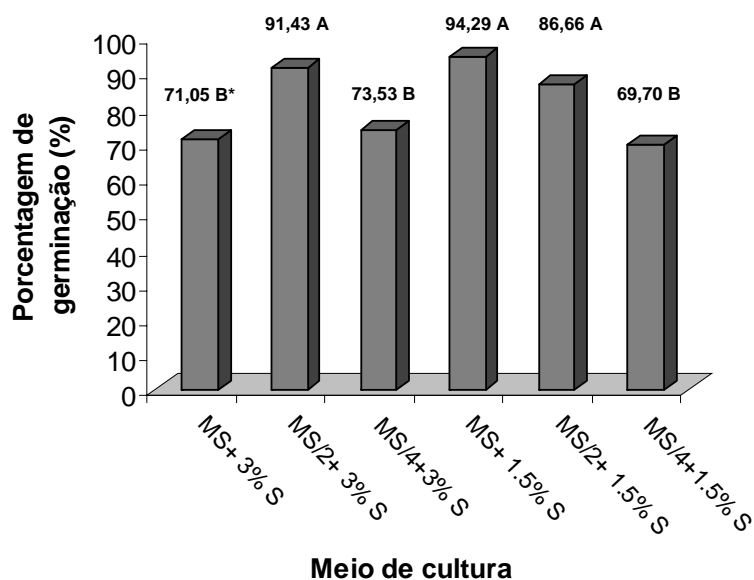
Na análise de variância para a porcentagem de germinação, constatou-se diferença entre os tratamentos (meios de cultura) a 5% de significância, pelo Teste F (Tabela 4).

Após 30 dias, as plântulas crescidas *in vitro* apresentaram características, como número de folhas e biomassa seca da parte aérea e radicular, estatisticamente diferentes entre os tratamentos, enquanto que o comprimento da parte aérea, diâmetro do caule, número e comprimento da raiz não diferiram entre si.

TABELA 3. Resumo da análise de variância para a porcentagem de germinação, biomassa seca da parte aérea e radicular, comprimento da parte aérea e radicular, número de folhas e raízes. UFLA, Lavras, MG, 2007.

QM									
F.V.	G.L. ¹	G.L. ²	Porcentagem de germinação (%) ²	Biomassa seca da P.A (mg) ²	Biomassa seca da P.R (mg) ²	Comprimento da P.A(mm) ¹	Comprimento da maior raiz (mm) ¹	Número de folhas ¹	Número de raízes ¹
Tratamento	5	5	419,20*	619,56*	49,30**	5844,29 ^{ns}	6019,18 ^{ns}	3,59**	0,99 ^{ns}
Resíduo	101	18	159,00	148,77	10,11	5241,04	9327,46	1,12	1,71
CV (%)			15,57	24,44	32,61	68,65	107,11	30,47	38,27

¹** , * , ^{ns}.Significativo, a 1 %, a 5% de probabilidade e não significativo, respectivamente pelo teste F.

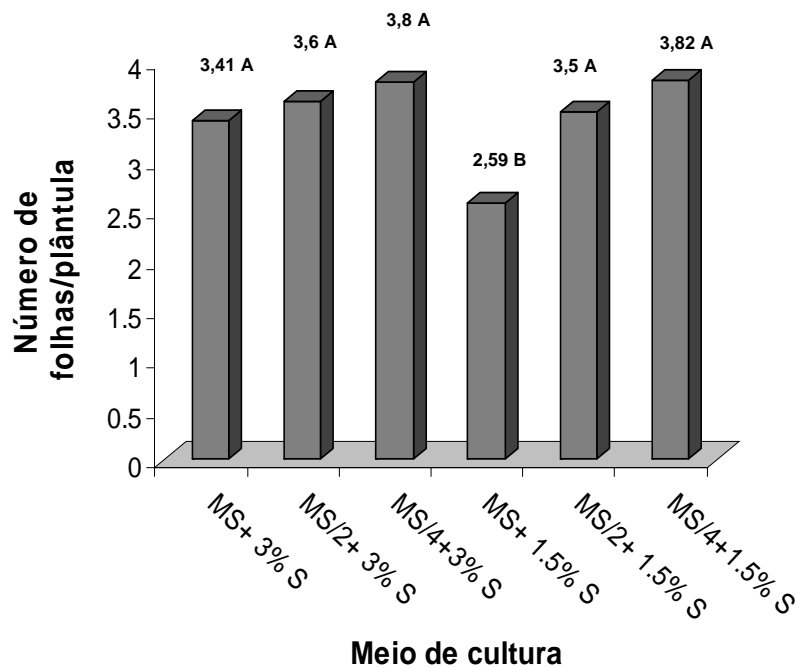


* As médias seguidas pela mesma letra pertencem estatisticamente ao mesmo grupo, pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

FIGURA 3. Porcentagem de germinação de sementes (%) do híbrido H1, aos 15 dias, em função dos tipos de meio de cultura. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Conforme a figura 3, os meios mais apropriados para a germinação das sementes híbridas foram o MS acrescido de 1,5% de sacarose, assim como os meios MS/2 acrescidos de 3% e 1,5% de sacarose. Esses meios possibilitaram a obtenção das porcentagens de germinação de 94,29%, 91,43% e 86,66%, respectivamente, não havendo diferença significativa entre eles. Os outros meios com porcentagens de germinação inferiores (73,53%; 71,05% e 69,70%) também não diferiram estatisticamente entre si.

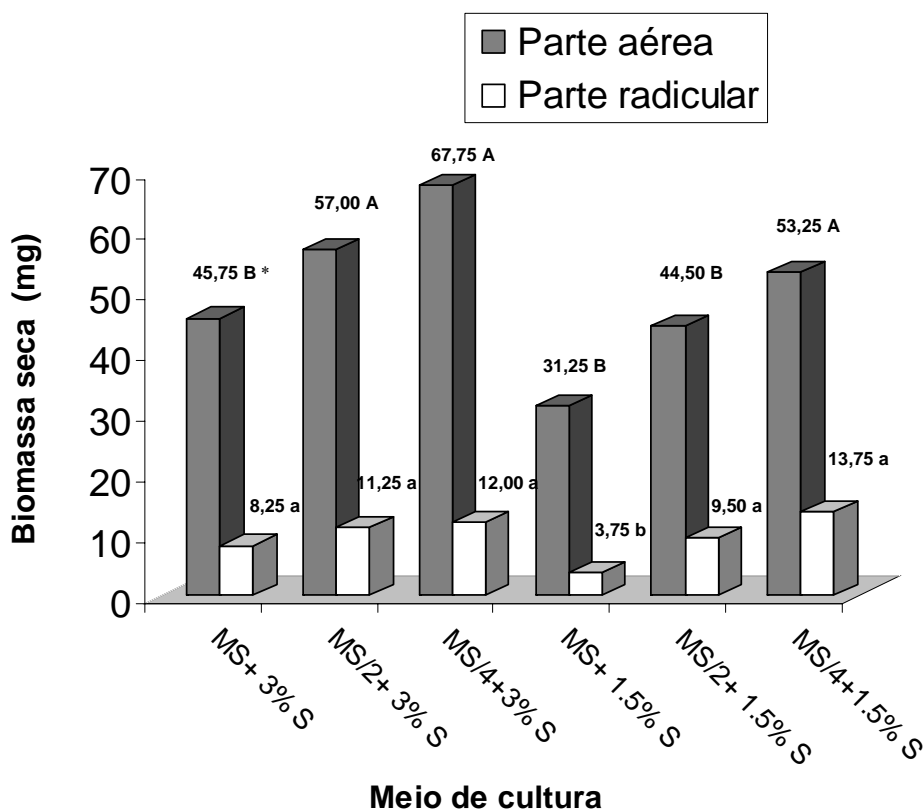
Conforme o teste de médias, para a variável número de folhas, o meio MS + 1,5% de sacarose teve uma média de 2,59 folhas/plântula, que foi significativamente inferior em relação a todos os outros meios, que variaram de 3,41 a 3,82 folhas/plântula (Figura 4).



* As médias seguidas pela mesma letra pertencem estatisticamente ao mesmo grupo, pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

FIGURA 4. Número de folhas de plântulas obtidas de sementes germinadas *in vitro* do híbrido triplóide H1 entre o capim-elefante e o milho, em função de diferentes tipos de meio de cultura, após 30 dias de cultivo. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Para a produção da biomassa seca, as menores médias foram também obtidas quando o cultivo foi realizado no meio MS + 1,5% de sacarose, sendo de 31,25 mg para a parte aérea e 3,75 mg para parte radicular. Pode-se observar uma tendência de aumento nas médias da biomassa seca em função da diminuição nas concentrações de sais do MS e no aumento da concentração de sacarose para 3% (Figura 5). O meio de cultura MS é um dos meios mais concentrados em macro e micronutrientes. O crescimento do sistema radicular do capim-elefante se mostrou sensível à concentração alta de sais.



* As médias seguidas pela mesma letra pertencem estatisticamente ao mesmo grupo, pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

FIGURA 5. Biomassa seca da parte aérea e da parte radicular de plântulas obtidas de sementes germinadas *in vitro* do híbrido triplóide H1 entre o capim-elefante e o milho, em função de diferentes tipos de meio de cultura, após 30 dias de cultivo. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Considerando os resultados da porcentagem de germinação, número de folhas e biomassa seca das plântulas, pode-se indicar o meio MS/2 complementado de 3% de sacarose como o mais apropriado para a germinação de sementes e o crescimento de plântulas *in vitro* do híbrido triplóide entre o capim-elefante e o milho. O mesmo resultado foi encontrado por Lameira

(2000), para embriões de cedro cultivados no meio de cultura MS com metade da concentração dos sais e acrescido de 3% de sacarose, o qual proporcionou maior taxa de germinação (100%) e maior crescimento das plântulas.

A diluição dos meios nutritivos tem sido utilizada em vários experimentos de germinação *in vitro*, apresentando bons resultados. Nesse contexto, Nogueira et al. (2004), verificaram em murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.), respostas semelhantes às observadas para o híbrido H1. Os autores testaram dois tipos de explantes (embriões e sementes) e diferentes meios de cultura (WPM, WPM/2, MS e M/2, acrescidos ou não de 3% de sacarose). Para embriões e sementes, o melhor meio foi WPM/2, na ausência de sacarose com 100% e 60% de germinação, respectivamente. Os mesmos autores observaram que, para a espécie em questão, no geral, os meios WPM e MS com a concentração de sais reduzida à metade, acrescidos ou não de sacarose, ofereceram melhores resultados na porcentagem de germinação, para ambos os explantes.

4.2 Obtenção de protoplastos de híbridos triplóides

A obtenção dos protoplastos foi muito dependente do material vegetal utilizado. Folhas de plântulas cultivadas *in vivo* e *in vitro* constituíram as melhores fontes (Figura 5). Os calos não se mostraram um bom material vegetativo para a obtenção de protoplastos dos híbridos H2 e H3. No entanto, um estudo no qual sejam considerados a idade dos calos e as diferentes combinações enzimáticas poderia viabilizar a obtenção de protoplastos.

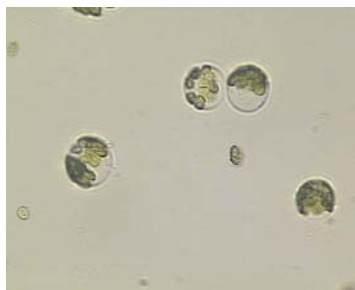


FIGURA 5. Protoplastos viáveis de tecido foliar *in vitro* do híbrido triplóide H3 entre o capim-elefante e o milho utilizando a solução enzimática E4. Note a presença de cloroplastos. Aumento de 400x em microscópio ótico.

Como base nos dados da Tabela 7, pode-se observar que a quantidade máxima de protoplastos extraídos das folhas *in vitro* do híbrido H2 foi de $27,75 \times 10^4$ protoplastos/mL, que foi obtida após cinco horas de digestão na solução enzimática 2 (E2- 1,0% celulase R-10; 0,2% macerozyme e 0,1% driselase). Já para o híbrido H3, o isolamento mais eficiente foi de $26,25 \times 10^4$ protoplasto/mL, obtidos após 3 horas de digestão pela solução enzimática 4 (E4- 2,0% celulase R-10; 0,2% macerozyme e 0,1% driselase).

Para os dois híbridos, os tratamentos com o explante foliar *in vitro* foram os que propiciaram uma maior quantidade de protoplastos e, entre esses tratamentos, a maior eficiência na digestão da parede celular do híbrido triplóide foi realizada pela combinação das enzimas celulase R-10, macerozyme e driselase. Devido às condições ambientais de cultivo *in vitro*, as folhas das plântulas mostram-se mais tenras, menores e mais finas do que as folhas das plântulas cultivadas *in vivo*, o que facilita a ação das enzimas. Essas diferenças morfológicas, provavelmente, se devem à menor intensidade de luz e à maior umidade nas condições *in vitro*.

Resultados semelhantes também foram relatados por Komai et al. (1996) que observaram um isolamento de $1,46 \times 10^7$ protoplastos/g de folhas *in vitro* de espinafre (*Spinacia oleracea* L.), quando tratadas, de 4 a 10 horas, pelas enzimas 2% de celulase R10 e 0,5% de macerozyme R10, bem como, Hu et al. (1999) que utilizaram a solução enzimática de 2,0% celulase RS, 1,0% macerozyme, 0,5% driselase, durante 15 a 20 horas, no isolamento de protoplasto de folhas *in vitro* e hipocótilo de várias espécies de *Brassica*.

Porém, Prasertsongskun (2004) obteve resultados inferiores quando isolou protoplasto de suspensões celulares derivadas de inflorescências de *Vetiveria zizanioides* Nash, uma gramínea, cujo melhor tratamento produziu apenas $8,4 \times 10^4$ protoplastos/mL em 10 horas de digestão enzimática, com 2,0% de celulase R-10 acrescido de 2,0% de macerozyme e 0,5% de pectinase.

TABELA 7. Quantificação de protoplastos viáveis ($\times 10^4$) obtidos de folhas *in vitro* e *in vivo* e de calos dos híbridos triplóides H2 e H4 em diferentes soluções enzimáticas, durante 5 horas de digestão. UFLA, Lavras, MG, 2007.

TRATAMENTO	HÍBRIDOS											
	H2		H3		H2		H3		H2		H3	
	1 hora		2 horas		3 horas		4 horas		5 horas			
Folhas <i>in vitro</i>	E1	0	0	1,25	2,63	2,0	3,0	0,5	3,0	5,63	3,38	
	E2	0	0	4,75	1,13	13,5	1,88	17,88	11,25	27,75	2,8	
	E3	0	0	0,75	3,88	3,88	8,5	11,63	18,63	10,25	11,63	
	E4	0	1,63	0,13	2,5	6,0	26,25	9,0	21,0	9,38	23,5	
	E5	0	0	0,5	0	2,63	0	1,25	0	1,25	0,38	
	E6	0	0	0,25	0	0,88	0	0,5	0	1,5	0,13	
	E7	0	0	1,25	0	1,25	0	2,63	0,5	3,0	0	
	E8	0	0	0,25	0	0,88	0	3,25	0,25	1,75	0,25	
Folhas <i>in vivo</i>	E1	0	0	0,13	0	0,13	0	0,25	0	0,63	0	
	E2	0	0	1,0	0	0,75	0	2,38	0,10	2,38	1,0	
	E3	0	0	0,63	0	0,5	0	0,25	0	1,0	0	
	E4	0	0	0	0	0,13	0	0,25	0,15	1,38	1,50	
	E5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,0	
	E6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,0	
	E7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,20	
	E8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,20	
Calos	E1-E8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

H2 = híbrido 2; H4= híbrido 3; E= solução enzimática; E1= 0,5 % celulase R-10, 0,2% macerozyme e 0,1% driselase; E2= 1,0 % celulase R-10, 0,2% macerozyme e 0,1% driselase; E3= 1,5 % celulase R-10, 0,2% macerozyme e 0,1% driselase; E4= 2,0% celulase R-10, 0,2% macerozyme e 0,1% driselase; E5= 0,5 % celulase R-10, 1,0% pectinase e 0,5% hemicelulase; E6= 1,0 % celulase R-10, 1,0% pectinase e 0,5% hemicelulase; E7= 1,5 % celulase R-10, 1,0% pectinase e 0,5% hemicelulase e E8=2,0% celulase R-10, 1,0% pectinase e 0,5% hemicelulase. Produção dada $\times 10^4$ protoplastos mL.

Para as folhas *in vivo*, obtiveram-se protoplastos, embora em pequena quantidade. No entanto, é interessante notar que, para ambos os híbridos, o mesmo tratamento enzimático que levou à obtenção de maior número de protoplastos de explantes *in vitro* repetiu-se para explantes *in vivo*. No caso do híbrido 2, o tratamento enzimático E2 permitiu obter apenas de $2,38 \times 10^4$ protoplastos/mL, após 5 horas de digestão, enquanto nas folhas *in vitro*, produziram $27,75 \times 10^4$ protoplastos/mL. Para o híbrido 3, a melhor solução enzimática foi a E4, do qual foram obtidos $1,5 \times 10^4$ protoplastos/mL após cinco horas de digestão das folhas *in vivo*, tendo sido necessárias apenas três horas de digestão das folhas *in vitro* para a produção de $26,25 \times 10^4$ protoplastos/mL (Tabela 7).

É importante ressaltar que a obtenção de protoplastos varia muito nos diferentes trabalhos estudados. Isso se deve, principalmente, ao tipo de cultivo do material vegetal e das condições de obtenção, além de muitos outros fatores, como o tipo de genótipo utilizado e das combinações enzimáticas usadas no estudo.

Vasil et al. (1983) isolaram protoplastos de suspensões celulares originados de calos de inflorescências de capim-elefante (*Penisetum purpureum*) e, após extensivos trabalhos, concluíram que o melhor tratamento enzimático foi com 2,5% de celulase R10, com ou sem 1,0% de macerozyme, que possibilitou isolar 80% de protoplastos, após 6 horas de digestão. Nesse mesmo trabalho, foram observadas fusões espontâneas quando acrescentados 0,5% de driselase e ou 0,5% de rhozyme, que levaram de 25% a 75% protoplastos fundidos. Esses resultados sugerem a necessidade de se testar maiores concentrações da enzima driselase nos tratamentos enzimáticos, para verificar a ocorrência de fusões espontâneas. Esse procedimento facilitaria a obtenção de protoplastos com o número de cromossômico duplicado, sem a necessidade de desenvolver metodologia específica para isso.

5 CONCLUSÕES

O meio de cultura mais eficiente para a germinação e o crescimento das plântulas *in vitro* do híbrido triploide 1 é composto pela metade dos sais do MS acrescido de 3% de sacarose.

As folhas de plântulas cultivadas *in vitro* são as melhores fontes para a obtenção de protoplasto.

A quantidade máxima de protoplastos extraídos das folhas do híbrido H2 cultivado *in vitro* é obtida em cinco horas de digestão, pela solução enzimática 2 e, para o híbrido H3, é obtida em três horas de digestão, pela solução enzimática 4.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, J. C. **Mixoploidia em híbridos de capim-elefante x milheto tratados com agentes antimitóticos**. 2002. 72 p. Tese (Doutorado em Agronomia. Genética e Melhoramento de Plantas)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ANTHONY, P.; OTONI, W. C.; POWER, J. B.; LOWE, K. C.; DAVEY, M. R. Protoplast isolation, culture, and plant regeneration from *Passiflora*. In: HALL, R.D. (Ed.). **Methods in molecular biology: plant cell culture protocols**. Totowa: Humana, 1999. v. 3, p. 169-181.

ASSANI, A.; CHABANE, D.; FOROUGHI-WEHR, B.; WENZEL, G. An improved protocol for microcallus production and whole plant regeneration from recalcitrant banana protoplasts (*Musa spp.*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, Netherlands, v.85, n.3, p 257-264, 2006.

BARBOSA, S. **Micropropagação e duplicação cromossômica de híbridos triploides de capim-elefante**. 2004. 119 p. Tese (Doutorado em Agronomia. Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2.ed. New York: Plenum, 1994. 445p.

BONAMIGO, L. A. A cultura do milheto no Brasil, implantação e desenvolvimento no cerrado. In: WORKSHOP INTERNACIONAL DE MILHETO, 1999, Planaltina, DF. **Anais...** Brasília: Embrapa-CPAC/Embrapa-CNPMS, 1999. p. 31-68.

BRUNKEN, J.N. A systematic study of *Pennisetum* Sect. *Pennisetum* (Gramineae). **American Journal of Botany**, New York, v. 64, n. 2, p. 161-76, 1977.

BUSTAMANTE, F. O.; PAIVA, E. A. A.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V. Análise mitótica de híbridos hexaplóides entre capim-elefante e milheto. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 4., 2007, São Lorenço. **Anais...** São Lorenço, MG: SBMP, 2007. CD-Rom.

CAMPOS, J. M. S.; DAVIDE, L. C, SALGADO, C. C.; SILVA, P. S.; ALVES, C. C. S.; PEREIRA, A. V.; VICCINI, L. F. Duplicação cromossômica em híbridos triploides entre capim elefante e milho – Análise de ploidia por citometria de fluxo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 4., 2007, São Lorenço. **Anais...** São Lorenço, MG: SBMP, 2007. CD-Rom.

CARNEIRO, V.T.C.; CONROI, T. Protoplastos de células vegetais In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: CBCTP/ EMBRAPA-CNPH, 1990. 433 p.

CARNEIRO, V. T. C.; CONROI, T.; BARROS, L. M. G.; MATSUMOTO, K. Protoplastos de células vegetais In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: CBCTP/EMBRAPA-CNPH, 1998. v. 2, 864 p.

CARVALHO, M. M.; XAVIER, D. F.; ALVIM, M. J. Desenvolvimento de pastagens. In: MARTINEZ, M. L.; COSER, A. C.; PEREIRA A. V.; ARCURI, P. B. (Org.). **Embrapa Gado de Leite: 25 anos desenvolvendo a pecuária de leite nacional**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001. p. 55-59.

COOMBS, J.; BALDRY, C. W.; BROW, J. E. The C-4 pathway in *Pennisetum purpureum*. 3. Structure and Photosynthesis. **Planta**, Berlin, v. 2, n. 110, p. 121-129, 1973.

CÓSER, A. C.; MARTINS, C. E.; FONSECA, D. M.; SALGADO, L. T.; ALVIM, M.J.; TEXEIRA, F. V. Efeito de diferentes períodos de ocupação da pastagem de capim-elefante sobre a produção de leite. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 5, p. 861-866, 1999.

CREPY, L.; BARROS, L. M. G.; VALENTE, V. R. N. Callus production from leaf protoplasts of various cultivars of bean (*Phaseolus vulgaris* L). **Plant Cell Reports**, Berlin, v.5, p.124-126, 1986.

CRUZ FILHO, A. B.; CÓSER, A. C.; FERREIRA, R. P.; MARTINS, C. E.; TELES, F. M.; VELOSO, J. R. ; BARBOSA NETO; OSTA, R. V. ; COSTA, C. W. C. Produção de leite a pasto usando capim-elefante: dados parciais de transferência de tecnologia no Norte de Minas Gerais. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 23., 1996, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: SBZ, 1996. v. 1, p. 504-506.

DANIELI, R.; GLÓRIA, M. **Giberelinas**. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas. Curso de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, 1998. Apostila.

DERESZ, F.; CÓSER, A. C.; MARTINS, C. E.; BOTREL, M. A.; AROEIRA, L. J. M.; MALDONADO, V. H.; MATOS, L. L. Utilização do capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) na produção de leite. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FORRAGEIRAS DE PASTAGEM., 1994, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, 1994. p. 183-199.

DIZ, D. A. **Breeding procedures and seed production management in pearl millet x elephant grass hexaploid hybrids**. 1994. 118 p. (PhD Thesis)-University of Florida, Florida.

FARIA, V. P. de. Formas de uso do capim-elefante. In: SIMPÓSIO SOBRE CAPIM-ELEFANTE, 2., 1994, Coronel Pacheco. **Anais...** Coronel Pacheco, MG: EMBRAPA/CNPGL, 1994. p. 139-148.

FERNANDES, M. C. **Avaliação tecno-econômica da gaseificação do capim-elefante para a eletrificação rural**. 2000. 77 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

FREARSON, E. M.; POWER, J. B.; COCKING, E. C. The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasto. **Developmental Biology**, v. 33, p.130-137, 1973.

GÓMEZ, E. O. **Estudo da pirólise rápida de capim elefante em leito fluidizado borbulhante mediante caracterização dos finos de carvão**. 2002. 369 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

HANDRO, W.; FLOH, E. I. S. Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p. 203-212.

HANNA, W. W. Method of reproduction in napiergrass and in the 3X and 6X allopolyploid hybrids with pearl millet. **Crop Science**, Madison, v. 21, p. 123-126, 1981.

HANNA, W. W.; GAINES, T. P.; GONZALEZ, B.; MONSON, W. G. et al. Effect of ploidy on yield and quality of pearl millet x napier grass hybrids. **Agronomy Journal**, Madison, v. 76, n. 6, p. 969-971, 1984.

HAYDU, Z.; VASIL, I. K. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissues and anthers of *Pennisetum purpureum* Schum. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 59, p. 269-273, 1981.

HILLESHEIM, A. **Fatores que afetam o consumo e perdas de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) sob pastejo**. 1987. 94 p. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

HU, Q.; ANDERSEN, S. B.; HANSEN, L. N. Plant regeneration capacity of mesophyll protoplasts from *Brassica napus* and related species **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, Netherlands, v. 59, p. 189-196, 1999.

ISHII, S. Enzymes for the isolation of protoplasts. In: BAJAJ, Y. P. S. **Biotechnology in agriculture and forestry**. Berlin: Springer-Verlag, 1989. v. 8, p. 23-33.

JAUHAR, P. P. **Cytogenetics and breeding of pearl millet and related species**. Alan R. Liss, New York Kalyane VL, Chatterji AK, 1981.

JAUHAR, P. P.; HANNA, W. W. Cytogenetics and genetics of pearl millet. **Advances Agronomy**, New York, v. 64, p. 1-26, 1998.

KANAY, R.; EDWARDS, G. E. Purification of enzymatically isolated mesophyll protoplasts from C3, C4 and crassulacean acid metabolism plants using an aqueous dextran-polyethylene glycol two phase system. **Plant Physiology**, v. 52, p. 484-490, 1973.

KOMAI, F.; MASUDA, K.; HARADA, T.; OKUSE, I. Plant regeneration from adventitious roots of spinach (*Spinacia oleracea* L.) grown from protoplasts. **Plant Science**, n. 120, p. 89-94, 1996.

KIM, J. B.; BERGERVOET, J. E. M.; RAEMAKERS, C. J. J. M.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Isolation of protoplasts, and culture and regeneration into plants in *Alstroemeria*. **In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, Wallingford, n. 41, p. 505-510, 2005.

LABOURIAN, L. G. **A germinação das sementes**. Washington: OEA, 1983. 174 p.

LAMEIRA, O. A.; GOMES, A. P. R.; LOPES, S. C. **Efeito da sacarose e luminosidade sobre a germinação “in vitro” de embriões de cedro**. Belém: EMBRAPA, 2000. p. 1-3. (Comunicado Técnico, 20).

- LARKIN, P. J. Purification and viability determinations of plant protoplasts. **Planta (Berl.)**, n. 128, p. 213-216, 1976.
- LAROUSSE. **Germinação**. In: GRANDE Encyclopaedia Delta. Nova Cultural, 1998. v. 11, p. 2701.
- MAYER, A. M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. New York: Pergamon, 1989. 210 p.
- MALDONADO, J. A. El pasto elefante o grama elefante *Pennisetum purpureum* (Schum). **Revista Industrial y Agrícola de Tucuman**, Tucuman, v. 39, n. 1-9, p. 22-29, 1955.
- MARCOS FILHO, J.; CÍCERO, M. S.; SILVA, W.R. da. **Avaliação da qualidade das sementes**. Piracicaba: FEALQ, 1987. 320p.
- MATSUMOTO, K.; CREPY, L.; TEXEIRA, J. B. Isolamento e cultura de protoplastos de banana. In: SIMPÓSIO DO TRÓPICO ÚMIDO, 1., 1984, Belém, PA. **Anais...** Brasília: EMBRAPA-DDT, 1984. v. 4, p. 245-251.
- MEDEIROS, R. B. **Formação e manejo de pastagens para a região do Planalto Médio e Missões**. Porto Alegre: Governo do Estado do Rio Grande do Sul. Secretaria de Agricultura, 1977. 48p.
- MIZUHIRO, M.; ITO, K.; MII, M. Production and characterization of interspecific somatic hybrids between *Primula malacoides* and *P. obconica*. **Plant Science**, n. 161, p. 489-496, 2001.
- MURASHIGE, T. Plant regeneration thorough organogenesis. **Annual Review Plant Physiology**, Palo Alto, v. 25, p. 135-166, 1974.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plant**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NASSOUR, M.; DORION, N. Plant regeneration from protoplasts of micropropagated *Pelargonium x hortorum* 'Alain': effect of some environmental and medium factors on protoplast system efficiency. **Plant Science**, n. 163, p. 169-176, 2002.
- NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; CASTRO, A. H.; VIEIRA, C. V.; ABBADE, L. C.; ALVARENGA, A. A. Germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 5, p. 1053-1059, set.out. 2004.

OLIVEIRA, R. P.; MENDES, B. M. J.; TULMANN, N. Determinação de metodologia para o isolamento de protoplastos de tangerina Cleópatra (*Citrus reshni* Hort.). **Scientia Agricola**, Piracicaba, n. 52, v. 1, p.38-42, 1995.

OTERO, J. R. **Informações sobre algumas plantas forrageiras**. 2.ed. Rio de Janeiro: SIA, 1961. 334 p.

PAIVA, E. A. A. **Meiose em híbridos hexaplóides de capim-elefante e milho**. 2006. 53 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Genética e Melhoramento de Plantas)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PASSOS, L. P.; KATTERMAN, F. Produção de calos embriogênicos em capim-elefante, em resposta a diferentes cultivos, explantes e reguladores de crescimento. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 23, n. 5, p. 743-753, 1994.

PEREIRA, A. V. Germoplasma e diversidade genética do capim-elefante. In: SIMPÓSIO SOBRE CAPIM-ELEFANTE, 2., 1994, Juiz de Fora, MG. **Anais...** Coronel Pacheco, MG: EMBRAPA – CNPGL, 1994. p. 1-11.

PEREIRA, A. V.; FERREIRA, R. P.; PASSOS, L. P.; FREITAS, V. P.; VERNEQUE, R. S.; BARRA, R. B.; SILVA, C. H. P. Variação da qualidade de folhas em capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) e híbridos de capim-elefante x milho (*P. purpureum* X *P. glaucum*), em função da idade da planta. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 2, p. 490-499; 2000.

PEREIRA, A. V.; VALLE, C. B.; FERREIRA, R. P.; MILES, J. W. Melhoramento de forrageiras tropicais. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. **Recursos genéticos e melhoramento**. Rondonópolis: Fundação Mato Grosso, 2001. p.549-602.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Mundi – Prensa, 1990. 326 p.

POWER, J. B.; COCKING, E. C. Isolation of leaf protoplasts: macromolecule uptake and growth substance response. **Journal of Experimental Botany**, v. 21, p. 64-70, 1970.

PRASERTSONGSKUN, S. Isolation and culture of suspension protoplasts of vetiver. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 26, n. 3, p. 411-416, 2004.

RAMULU, K. S.; DIJKHUIS, P.; ROEST, S. Patterns of phenotypic and chromosome variation in plants derived from protoplast cultures of monohaploid, dihaploid genotypes and in somatic hybrids of potato. **Plant Science**, v. 60, p. 101–110, 1989.

REIS, M. C. **Potencial de utilização da seleção recorrente na população de capim-elefante hexaplóide**. 2005. 67 p. Tese (Mestrado em Agronomia. Genética e Melhoramento de Plantas)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ROSAL, L. F. **Germinação, indução de calos, micropropagação e anatomia foliar da candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) Mac Leish)**. 2004. 106 p. Tese (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ROTH, P. S. **Indução de poliploidia em clones de *Eucalyptus urophylla* S. T., Blake**. 1984. 79 p. Dissertação (Mestrado em Genética de Plantas)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

SHEPARD, J. F.; TOTTEN, R. E. Mesophyll cell protoplasts of potato. **Plant Physiology**, v. 60, p. 313-316, 1977.

SHIBA, T.; MII, M. Plant regeneration from mesophyll and cell suspension-derived protoplasts of *Diathus acicularis* and characterization of regenerated plants. **Vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, Wallingford, v. 41, p. 794-800, 2005.

TAKEBE, I.; OTSUKI, Y.; AOKI, S. Isolation of tobacco mesophyll cells in intact and active state. **Plant and Cell Physiology**, v. 9, p. 115-124, 1968.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J.A.; SA, M. F. G. de; NASCIMENTO, A. S.; BRIGIDO, M. de M.; PINHO, E. R. C. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: EMBRAPA Hortaliças, 2000. 128 p.

TOSI, H. **Ensilagem de gramíneas tropicais sob diferentes tratamentos**. 1973. 107 f. Tese (Doutorado em Produção Animal)- Universidade Estadual Júlio Mesquita Filho, Botucatu, SP.

TRABELSI, S.; GARGOURI-BOUZID, R.; VEDEL, F.; NATO, A.; LAKHOUA, L.; DRIRA, N. Somatic hybrids between potato *Solanum tuberosum* and wild species *Solanum vernei* exhibit a recombination in the plastome. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, Netherlands, n. 83, p.1-11, 2005.

UCHIMIYA, H.; MURASHIGE, T. Evaluation of parameters in the isolation of viable protoplasts from cultured tobacco cells. **Plant physiology**, v. 57, p. 936-944, 1974.

VASIL, V.; WANG, D.; VASIL, I. K. Plant Regeneration from protoplasts of Napier Grass (*Pennisetum purpureum* Schum.). **Z. Pflanzenphysiol**, v. 111, p. 233-239, 1983.

VEIGA, J. B.; MOTT, G. O.; RODRIGUES, L. R. A.; OCUMPAUGH, W. R. Capim-elefante anão sob pastejo. I - Produção de forragem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 929-36, 1985a.

VEIGA, J. B.; MOTT, G. O.; RODRIGUES, L. R. A.; OCUMPAUGH, W. R. Capim-elefante anão sob pastejo. II - Valor Nutritivo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 937-44, 1985b.

VIEIRA, M. L. C. Hibridação somática em plantas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 1, n. 3, 1997.

VILELA, D.; DAYRELL, M. S.; CRUZ, G. M. Efeito da altura de corte do capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) e de diferentes tratamentos sobre a produção e qualidade da silagem. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite. **Relatório técnico anual do CNPGL – 1980**. Coronel Pacheco, MG: EMBRAPA-CNPGL, 1981. p. 83-88.

VILELA, H.; RODRIGUEZ, N.; DIAS TEIXEIRA, E. Produção de forragem de um híbrido hexaplóide (*Pennisetum glaucum* X *Pennisetum purpureum*) e seu valor nutritivo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 34., 1997, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora, MG: SBZ, 1997.

VILELA, H. et al. Efeito da idade planta sobre a produção e valor nutritivo do capim elefante Paraíso (*Pennisetum hybridum*). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRAZILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., 2001, Picacicaba. **Anais...** Piracicaba, SP: SBZ, 2001. p. 300-321.

VILELA, H. et al. Produção e composição química do capim elefante Paraíso submetido a três alturas de corte. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39., 2002, Recife. **Anais...** Recife, PE: SBZ/URPE, 2002. CD-ROM.

ZUNIGA, M.C.P., SYKES, D.J., GOMIDE, J.A.. Competição de treze gramíneas forrageiras para corte, com ou sem adubação, Minas Gerais. **Revista Ceres**, Viçosa, v 123, n. 77, p.324-43,1967.