

E. Aranzales, D. P. Medina, A. Ciprian, M. Vélez, L. G. Santos

Programa de Recursos Genéticos – CIAT, Palmira, Valle del Cauca, Colombia.

Autor para correspondencia: e.aranzales@cgiar.org

INTRODUCCIÓN

La colección de forrajes tropicales del programa de recursos genéticos conserva 23.140 accesiones correspondientes a 734 especies de 128 géneros. Dentro de esta colección se encuentran las gramíneas del género *Brachiaria* que corresponden a 601 accesiones representadas en 23 especies identificadas. Este es el forraje más ampliamente cultivado en regiones tropicales y subtropicales para los sistemas agropastoriles, debido a su tolerancia a suelos ácidos y pobres y a la buena calidad nutricional de algunas de sus especies. Tradicionalmente los procesos de multiplicación y regeneración del germoplasma de *Brachiaria* se realizan en condiciones de campo; en estas condiciones es factible el ataque de patógenos como virus, bacterias, insectos, nematodos y hongos que afectan la calidad fitosanitaria del germoplasma, causando la pérdida de semilla, baja tasa de germinación y restricción en su distribución. En este trabajo se presentan las condiciones desarrolladas para la introducción *in vitro* (semillas botánicas y material vegetativo), multiplicación y preparación de muestras para distribución internacional que viene desarrollando el grupo de conservación *in vitro* para *B. brizantha*, *B. subquadriflora*, *B. decumbens*, *B. arrecta*, *B. humidicola*, *B. plantaginea* y *B. ruziziensis*. Las técnicas *in vitro* ofrecen una alternativa complementaria en las actividades de conservación y distribución de germoplasma para estos materiales, lo anterior teniendo en cuenta que las colecciones son mantenidas en campo, pocas accesiones se conservan mediante semilla de buena calidad y que no existen protocolos para la conservación *in vitro*.

OBJETIVOS

Desarrollar protocolos para el establecimiento y manejo *in vitro* de germoplasma de *Bracharia* spp.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales utilizados para el desarrollo de este trabajo hacen parte de la colección de germoplasma conservada por el programa de recursos genéticos del CIAT (Tabla 1). Su conservación es tradicionalmente realizada a través de semilla botánica y/o como colección en campo (Figura 1)

Tabla 1. listado de accesiones de *Brachiaria* spp usadas para la realización de este trabajo.

Número de material	Especie	Viabilidad (%) / TZ	Disponibilidad sanitaria
16121	<i>B. brizantha</i>	90	Rechazada
16125	<i>B. brizantha</i>	93	Rechazada
16467	<i>B. brizantha</i>	84	Rechazada
16488	<i>B. brizantha</i>	86	Rechazada
16843	<i>B. arrecta</i>	Sin semillas	Sin semillas
16844	<i>B. arrecta</i>	Sin semillas	Sin semillas
16845	<i>B. arrecta</i>	Sin semillas	Sin semillas
16888	<i>B. humidicola</i>	64	Rechada
26146	<i>B. humidicola</i>	Sin semillas	Sin semillas
26740	<i>B. plantaginea</i>	Sin semillas	Sin semillas
26871	<i>B. ruziziensis</i>	85	Rechazada
606	<i>B. decumbens</i>	92	Rechazada

Viabilidad (%): estimado por prueba de tinción en tetrazolol (TZ); SD: Sin información



Figura 1. Sistemas de conservación



Figura 2. Esquema general de la metodología usada para la introducción *in vitro* de *Brachiaria* spp.

Las siembras en ambos casos se realizaron en medio Murashige and Skoog (1962), puestas bajo condiciones de crecimiento: 28-30°C, fotoperiodo de 12 horas e intensidad lumínica de 1200 lux. Después de cinco días se evaluó la presencia de contaminación.

RESULTADOS

Establecimiento *in vitro*

Semillas: la desinfección de semillas sin gluma con alcohol al 70° durante 10 segundos, solución de fungicida 2 gr/L durante 15 min, hipoclorito de sodio al 2.5% durante 5 min y tres enjuagues con agua destilada estéril permitió la germinación bajo condiciones *in vitro*.

Sin embargo la presencia de hongos de interés cuarentenario como *Phoma* spp., *Colletotrichum* spp. y *Drechslera* spp. dificultan la introducción de estos materiales a partir de semilla botánica, esto puede superarse con el uso de material vegetativo que es previamente mantenido bajo condiciones de invernadero con la aplicación periódica de fungicida.

Material vegetativo: se realizó una pre-desinfección para bajar la carga de contaminantes que podría estar presente en los mismos. Este incluye alcohol al 70° durante 10 segundos, solución fungicida 2 gr/L por 30 minutos, hipoclorito de sodio al 2.5% por cinco minutos y un enjuague con agua destilada estéril.

Posteriormente en la cámara de flujo laminar se aplicó a las yemas de aprox. 1 cm el mismo protocolo de desinfección usado para las semillas. Después de cinco días se evaluó la presencia de contaminación. Este proceso permitió el establecimiento del 50% de los explantes tratados



Figura 3. Plantas obtenidas del proceso de introducción

Se logró la introducción *in vitro* a partir de material vegetativo de las accesiones CIAT 16843, CIAT 16844, CIAT 16845, CIAT 26146 y CIAT 26740 (Figura 3).

Multiplicación *in vitro*

Los plántulas obtenidas durante la fase de establecimiento fueron transferidas a un medio para la inducción de brotes múltiples, después de tres semanas los brotes fueron individualizados y transferidos a medio fresco (Figura 4). Ensayos de las combinaciones y relaciones hormonales se encuentran en curso para establecer tasas de multiplicación.

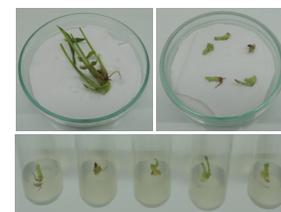


Figura 4. Proceso de multiplicación de brotes múltiples

Para envíos internacionales se prevé el despacho de un explante por tubo en medio MS.

CONCLUSIONES

Las técnicas *in vitro* ofrecen alternativas complementarias y/o temporales para facilitar la conservación y distribución de germoplasma de accesiones donde la producción de semilla botánica es escasa (p.e. *B. arrecta* – CIAT 16843) y en materiales donde la semilla no cumple con los criterios de aceptación sanitaria (p.e. CIAT 16121, CIAT 16125, CIAT 16845).

Se continuarán los ensayos con el propósito de establecer las condiciones óptimas para la multiplicación, enraizamiento *in vitro* y conservación por mínimo crecimiento de las diferentes especies de este género conservadas en el banco de germoplasma del CIAT.

En los próximos meses se estarán realizando los primeros despachos de muestras *in vitro* a usuarios de Brasil, Japón y Estados Unidos. Una estimación de los costos del mantenimiento *in vitro* de estos permitirá tomar decisiones frente al manejo futuro de estos materiales bajo este esquema de conservación.

REFERENCIAS

- Casaya, T. 2004. Establecimiento del protocolo de multiplicación *in vitro* para pasto Toledo (*Brachiaria brizantha* CIAT 26110): Fase I. Trabajo de graduación. Guácimo, C.R. Universidad EARTH. 46p.
- Miles, J; Maass, B; Valle, C. 1998. *Brachiaria*: Biología, Agronomía y Mejoramiento. Cali. CO. CIAT. 312p.
- Murashige, and F. Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473–497.