



Apostila de Biotecnologia 1 – Cultura de tecidos vegetal

Material de Apoio - 8º Fase do Curso de Agronomia - CCA/UFSC, Florianópolis

Introdução ao conceito de Biotecnologia

As biotecnologias em seu sentido mais amplo compreendem a manipulação de microorganismos, plantas e animais, objetivando a obtenção de processos e produtos de interesse. Desta maneira, toda atividade que envolva a aplicação dos conhecimentos de fisiologia, bioquímica e genética, é considerada como técnica biotecnológica. Em seu senso mais restrito as biotecnologias estão associadas ao emprego das técnicas modernas de biologia molecular e celular. Outros conceitos de biotecnologias: a) a utilização de sistemas celulares para a obtenção de produtos e desenvolvimento de processos (CNPq); b) a aplicação dos princípios científicos e de engenharia para o processamento de materiais por agentes biológicos proporcionando produtos ou serviços (FAO, 1989); c) o uso das técnicas de regeneração *in vitro* e do DNA recombinante (Fernandes, 1987).

Uma das principais características das biotecnologias modernas é sua abrangência ampla e seu caráter multidisciplinar. Sua inserção em países com padrões desiguais de desenvolvimento deve ser baseada no conceito de biotecnologias apropriadas ou pertinentes, proposto pela FAO. Assim, biotecnologias apropriadas seriam aquelas que contribuem com o desenvolvimento sustentável por: a) serem tecnicamente factíveis no atual contexto de desenvolvimento técnico-científico do país; b) proporcionarem benefícios mensuráveis aos destinatários; c) serem ambientalmente seguras, socio-economicamente e culturalmente aceitáveis no atual estágio de desenvolvimento do país.

Dentre as muitas aplicações destas técnicas, destacam-se aquelas relacionadas com a transferência de genes de organismos diferentes para a incorporação de características como a resistência de pragas e patógenos e a estresses abióticos, no genoma de uma determinada planta. Outras aplicações visam o aumento da eficiência fotossintética ou a produção de metabólitos e constituintes importantes do ponto de vista nutricional e farmacêutico. Estas técnicas, quando associadas com procedimentos de cultura de tecidos, permitem a propagação rápida e massal de genótipos superiores estáveis e isentos de doenças.

Novas estratégias para a propagação clonal, para a fixação de ganhos genéticos e novas abordagens para gerar variação genética são requisitos fundamentais para o melhoramento de plantas. Desta maneira, um dos maiores benefícios das técnicas de cultura de tecidos vegetais para o melhoramento de plantas perenes, refere-se à possibilidade de capturar e fixar os componentes aditivos e não aditivos da variância genética através da propagação clonal. Desta maneira estas técnicas, baseadas que são na totipotencialidade de explantes, podem se tornar ferramentas poderosas para a propagação massal de genótipos superiores.

A possibilidade de manipulação de sistemas *in vitro* para a clonagem de genótipos superiores de espécies vegetais é dependente de uma série de fatores. A compreensão e domínio de conceitos básicos em fisiologia do desenvolvimento é de fundamental importância para a aplicação deste conhecimento. Um dos objetivos do presente texto é a apresentação e a discussão sucinta dos principais tópicos pelos quais é possível extrair-se respostas morfogenéticas orientadas quando correlações morfológicas, fisiológicas, genéticas e bioquímicas, existentes em uma planta intacta são rompidas e sistemas de culturas de tecidos células e órgãos são utilizados para "orientar" novos padrões morfogenéticos.

Micropropagação

Diferentes rotas morfogenéticas para a obtenção de plantas *in vitro*

1.1 Cultura de tecidos desorganizados

Calos – Cultivo e manutenção de massas celulares desorganizadas que se originam da proliferação desordenada a partir de tecidos ou órgãos cultivados *in vitro*.

Suspensões – Proliferação de células isoladas ou pequenos aglomerados dispersos em um meio líquido, sob agitação.

1.2 Cultura de estruturas organizadas

Cultura de órgãos – Formas organizadas de crescimento podem ser mantidas continuamente *in vitro*. Inclui o isolamento asséptico de estruturas definidas como primórdios e segmentos foliares. Para os propósitos da micropropagação, os mais importantes tipos são:

a) **Cultura de meristemas** – Ápices meristemáticos consistindo do domo apical isentos ou contendo um ou dois primórdios foliares. Originam eixos unipolares caulinares.

b) **Cultura de ápices caulinares** – Iniciada a partir de ápices caulinares ou gemas laterais. Empregada para estabelecer culturas que originam multígemas, gemas, eixos ou brotações caulinares múltiplos.

c) **Culturas de segmentos nodais** – Contém segmentos caulinares que carregam gemas simples ou múltiplas.

d) **Cultura (ou resgate) de embriões** – Embriões zigóticos são excisados e cultivados para dar origem à plântulas.

e) **Cultura de raízes isoladas** – Raízes cultivadas sem conexão com os eixos caulinares, originando novas raízes.

1.3 Quanto a rota morfogenética

1. **Organogênese direta** – Gemas ou primórdios de gemas pré-existentes que são induzidas à proliferação.

2. **Organogênese indireta** – Novas gemas e eixos caulinares são induzidos e formados a partir de tecidos não organizados (calos) originados de explantes de diferentes origens.

2. BASE CONCEITUAL

Ápice caulinar: segmento do ápice do caule, composto pelo meristema apical (0,05 a 1,0 mm) juntamente com os primórdios foliares e folhas em desenvolvimento. Porém, não deve ser confundido com o meristema, que é o conjunto de células indiferenciadas e de características embrionárias.

Ativação: processo que favorece a reentrada ao novo ciclo bioquímico ou fisiológico de órgão ou tecido. É muito comum referir-se a ativação de gemas. Para ocorrer a ativação é necessária a existência de órgão ou tecido pré formado ou formado.

Células indiferenciadas: refere-se ao estado caracterizado por células isodiamétricas, com pouco ou nenhum vacúolo e grande núcleo. Geralmente estão localizadas no meristema e mantém as características embrionárias.

Ciclo celular: processo ou fases celulares de divisão padrão. Enquadra-se em dois grandes grupos: meiose e mitose, que em um organismo diplóide pode originar respectivamente uma nova célula haplóide, quando ocorre a saída do ciclo celular no final de G2 (sem a duplicação dos cromossomos) ou diplóide, quando do completo processo de divisão celular (cdc).

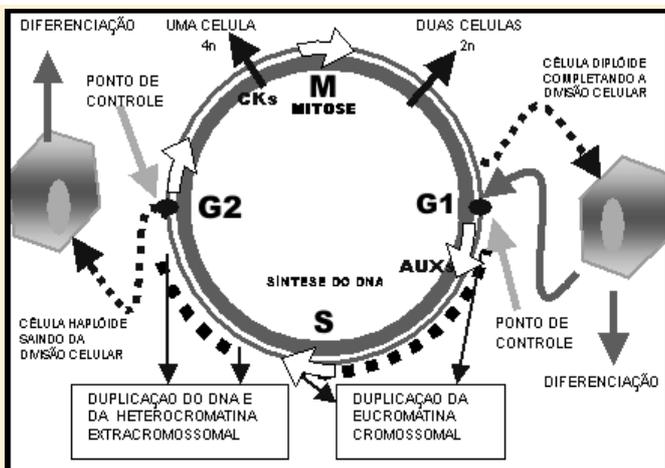


Figura 01 – Diagrama representativo do ciclo de divisão celular (cdc) de uma célula diplóide. (Adaptado de George, 1993).

Clones: Independente da origem e sob o aspecto aplicado, as técnicas de cultura de tecidos vegetais permitem a propagação clonal massal de genótipos superiores. Segundo o Código Internacional de Nomenclatura de Plantas Cultivadas, **clone** é uma das categorias básicas da cultivar e designa um conjunto geneticamente uniforme de indivíduos, derivados originalmente de um indivíduo simples por propagação assexuada (enxertia, estaquia, mergulhia, apomixia ou micropropagação). O conceito de propagação clonal implica na **seleção** de genótipos com graus variados de heterozigose e sua **fixação** nas gerações subseqüentes (Kester, 1983). Clones são empregados no melhoramento de plantas para capturar os componentes aditivos e não-aditivos da variância genética. Os componentes aditivos da variância genética baseiam-se no efeito independente dos alelos, enquanto que os efeitos não-aditivos, muitas vezes perdidos nos cruzamentos sexuais, baseiam-se na interação dos alelos, dentro ou entre locus (Durzan, 1988). Uma das maiores vantagens da propagação clonal é a possibilidade de se explorar a variância genética total, ao invés dos componente aditivo apenas. Muitos dos programas de melhoramento genético de plantas perenes e estabelecidos no hemisfério norte, a partir da década de 50, foram baseados na seleção recorrente. Nestes programas a seleção é feita após cada geração de intercruzamentos de materiais selecionados para proporcionar a recombinação genética. Enquanto que o melhoramento convencional permite a fixação dos ganhos genéticos nas gerações subseqüentes, a micropropagação permite a exploração da variação genética em uma geração, através da clonagem de genótipos superiores (Figura 2). Apesar dos benefícios dos clones para a agricultura, a concentração de uma produção em larga escala de apenas um genótipo ou de poucos genótipos de origem comum pode tornar todas as plantas igualmente vulneráveis à pragas e moléstias ou estresses abióticos e pode também diminuir o interesse na manutenção de uma diversidade mais ampla nos bancos de germoplasma existentes, resultando no estreitamento da base genética.

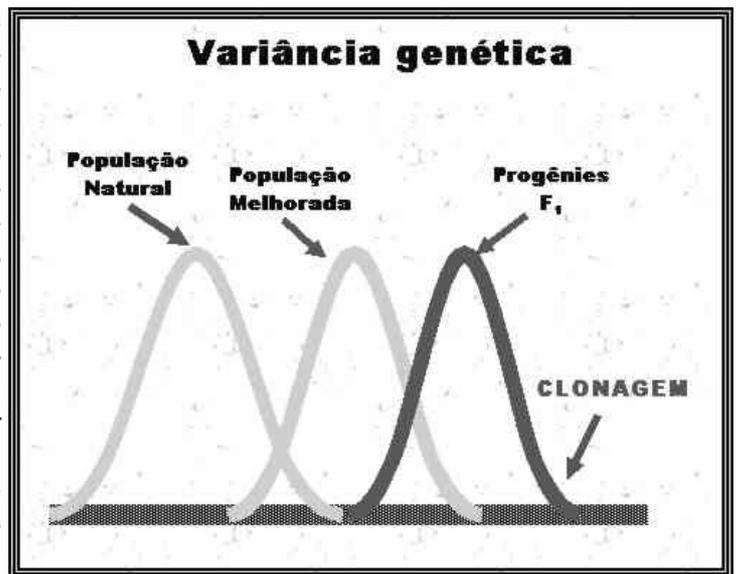


Figura 02 - Exploração da variação genética em uma geração, através da clonagem de genótipos superiores.

Crescimento desorganizado: Quando, tecidos formados *in vitro*, não apresentam estruturas claramente definidas e contém um número limitado de células especializadas e diferenciadas. Uma célula diferenciada é aquela que desenvolveu forma especializada (morfologia) ou função especializada (fisiologia). Um tecido organizado é a agregação de células diferenciadas (ex. xilema ou epiderme). Por outro lado estruturas indiferenciadas podem ocorrer na indução de calos que são agregados celulares desorganizados que se originam da proliferação desordenada a partir de tecidos ou órgãos cultivados *in vitro* e por meio de suspensões celulares que são a proliferação de células isoladas ou pequenos aglomerados de células dispersos em um meio líquido, sob agitação

Crescimento organizado – Tecido ou órgão de crescimento determinado em produzir um novo órgão (desenvolvimento) de forma a resultar novas estruturas vegetais. Crescimento pós meristemático.

Competência celular: Capacidade das células reagirem a sinais (que podem ser reguladores de crescimento) específicos de desenvolvimento. Diz respeito à capacidade das células em expressar um potencial inerente. Esta habilidade da célula pode se dar por: a) Ativação que pode ser definida como a mudança na competência envolvendo a rediferenciação de determinadas células (modelos diretos); b) Indução: que pode ser definida como a iniciação de uma resposta particular de diferenciação a partir da desdiferenciação celular (modelos indiretos). A indução está associada à processos de desdiferenciação, que pode ser definida como a (re)entrada no ciclo celular. Buvat (1944) demonstrou que a desdiferenciação celular consiste de dois estágios: regressão à capacidade de divisão e retorno à estrutura citológica de célula meristemática (embrionária)

Cultura de órgãos: Formas organizadas de crescimento podem ser mantidas continuamente in vitro. Inclui o isolamento asséptico de estruturas definidas como primórdios e segmentos foliares. Para os propósitos da micropropagação, os mais importantes tipos são:

f) Cultura de meristemas: Ápices meristemáticos consistindo do domo apical isentos ou contendo um ou dois primórdios foliares. Originam eixos unipolares caulinares.

g) Cultura de ápices caulinares – Iniciada a partir de ápices caulinares ou gemas laterais. Empregada para estabelecer culturas que originam multígemas, gemas, eixos ou brotações caulinares múltiplos.

h) Culturas de segmentos nodais – Contém segmentos caulinares que carregam gemas simples ou múltiplas.

i) Cultura (ou resgate) de embriões – Embriões zigóticos são excisados e cultivados para dar origem à plântulas.

j) Cultura de raízes isoladas – Raízes cultivadas sem conexão com os eixos caulinares, originando novas raízes.

Diferenciação: processo de diversificação das características bioquímicas, anatômicas, morfológicas e fisiológicas, ocorrida nas células, nos tecidos ou órgãos durante o desenvolvimento a partir do estado meristemático ou juvenil para o adulto. As células do embrião meristema apical são exemplos de estado indiferenciado, as quais ganham novas competências se tornando diferenciadas.

Desdiferenciação celular: retorno de células diferenciadas ao estado meristemático não diferenciado.

Determinação celular: Processo pelo qual o potencial de desenvolvimento de uma célula torna-se limitado a uma rota específica (Christianson, 1985). A determinação celular diz respeito a uma canalização progressiva no desenvolvimento.

Epigênese: Ativação seletiva e diferencial de genes (reprogramação celular). Um exemplo comumente citado como representativo em uma planta intacta é a transição da fase juvenil para a fase adulta.

Epistasia: refere-se à inativação de um (trans)gene (o supressor) sobre um outro (trans)gene.

Indução: é o desencadeamento de um processo morfogenético pela exposição do explante a um estímulo físico, químico ou biológico. A indução envolve o controle da expressão gênica, embora não seja um fenômeno genético, pois não ocorre ganho ou perda genética (modificação alélica ou genotípica). Refere-se somente a expressão dos genes pré existentes. Em cultura de tecidos, é a sinalização por um fitormônio a uma resposta específica a nível celular.

Haplóide: indivíduo que apresenta o número de cromossomos igual ao do gametófito ou da haplofase (n). de maneira mais específica, plantas haplóides são aquelas com carga cromossômica não duplicada, monoplóides.

Hormônios vegetais: No presente contexto este termo define uma das classes de compostos que regulam processos de desenvolvimento (morfogênese) em plantas, sendo, provavelmente, os mais importantes mediadores na transdução de sinais. Os hormônios são moléculas regulatórias de ocorrência natural que agem como sinais químicos para regular o crescimento e o desenvolvimento (morfogênese). Fitorreguladores ou reguladores de crescimento são substâncias sintéticas que mimetizam os efeitos dos hormônios no metabolismo celular.

Meristema: tecido composto de células não diferenciadas, envolvido com síntese protoplasmática e formação de novas células por divisão mitótica. Sem especificação, o termo refere-se normalmente ao meristema apical do caule (região localizada numa depressão central que dá origem aos mais novos primórdios foliares de tamanho variável entre espécies vegetais, normalmente formado por uma porção de 60 a 100 células isodiamétricas indiferenciadas, que mantém permanentemente as características embrionárias primárias.

Micropropagação: Propagação clonal massal de um genótipo selecionado por técnicas de cultura in vitro. Este termo, utilizado primeiramente por Hartman e Kester (1975), passou a ser empregado para definir os processos de propagação vegetativa na cultura de tecidos vegetais.

Morfogênese: Integração entre crescimento (mudanças quantitativas) e diferenciação (alterações qualitativas), mediada por divisão e especialização celular. A morfogênese é o resultado de um complexo controle hormonal múltiplo, espacial e temporal, através da regulação e expressão de sistemas gênicos múltiplos. A morfogênese na planta intacta é mediada pela ação correlativa dos meristemas e de seus produtos. Na cultura de tecidos vegetais, ao se romper as correlações endógenas os tecidos ficam sujeitos às condições exógenas, representadas no caso pelos fitorreguladores adicionados ao meio de cultura. A morfogênese *in vitro* passa então a ser modulada pelo balanço de fitorreguladores adicionados ao meio de cultura. Isto foi comprovado experimentalmente por Skoog e Miller (1955) e cujos resultados são sumarizados na figura 03.

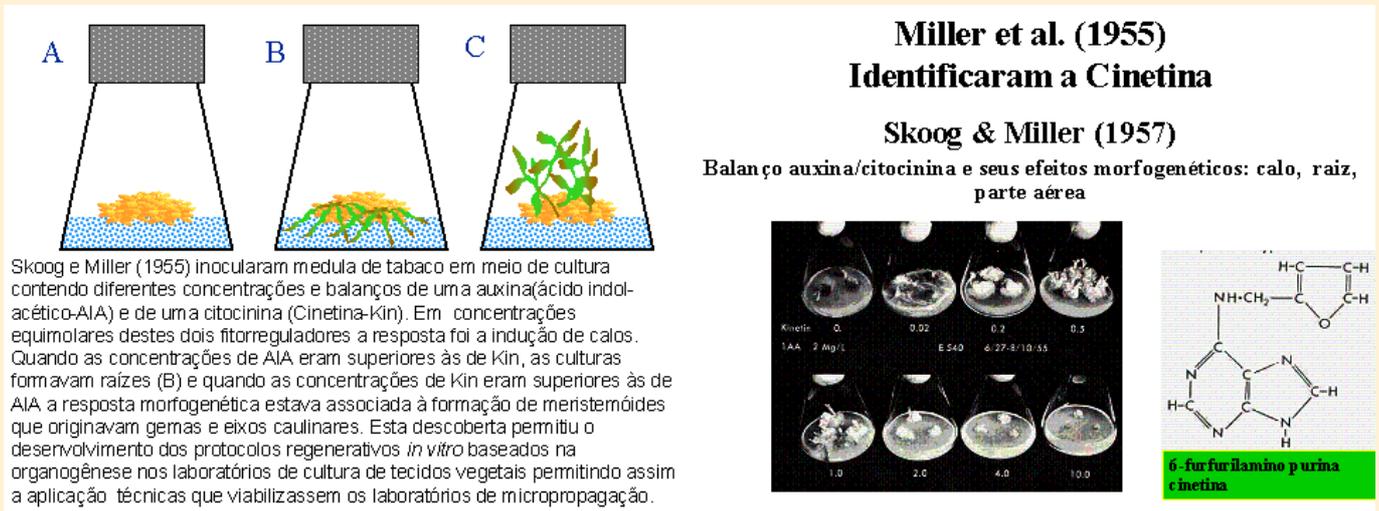


Figura 03 - Morfogênese *in vitro* modulada pelo balanço de fitorreguladores adicionados ao meio de cultura.

Totipotencialidade: Princípio biológico creditado ao fisiologista vegetal alemão Haberlandt, que em 1902, enunciou que cada célula vegetal possuía o potencial genético para reproduzir um organismo inteiro. Como corolário, este fisiologista elaborou previsões de que tecidos, células e órgãos poderiam ser mantidas indefinidamente em cultura. De certa forma o conceito de totipotencialidade já era inerente à teoria celular de Schleiden e Schwann (1838 apud Vasil et al., 1979) ao postularem que algumas células eram capazes de serem separadas do organismo e continuar a crescer

3. MECANISMOS REPRODUTIVOS E PADRÕES DE DESENVOLVIMENTO ENTRE ANIMAIS E PLANTAS

Plantas e animais apresentam similaridades na natureza de seu material genético e nos mecanismos pelos quais a informação genética é processada e utilizada. Nos outros níveis as diferenças são óbvias e consideráveis:

- Plantas não estabelecem uma linhagem germinativa específica, não havendo distinção entre células que formam o organismo e as células reprodutivas. Em animais os gametas são produzidos apenas por células-filhas descendentes de uma linhagem germinativa. Todas as células vegetais nucleadas, possuem, em princípio, a capacidade de produzir um novo indivíduo (totipotencialidade) e a possibilidade de uma célula produzir gametas é apenas uma função de sua localização no organismo.
- Plantas se reproduzem tanto sexuada como assexuadamente.
- O ciclo de vida de uma planta é mais elaborado e complexo do que em animais. Neste a reprodução resulta da produção direta de gametas como resultado da meiose na linhagem de células germinativas. O ciclo de vida das plantas envolve duas gerações alternantes. A geração dominante é a esporofítica e inicia com a fertilização do ovo e culmina com o desenvolvimento e maturação. A geração gametofítica, através da microsporogênese e megasporogênese gera respectivamente pólen e saco embrionário. Um dos núcleos da célula espermática masculina fecunda o ovo para formar o zigoto, marcando o fim da geração gametofítica e o início da esporofítica. A embriogênese é acompanhada pela formação da semente, que é, em última análise, uma estrutura complexa para nutrir o embrião.

O desenvolvimento animal pode ser confundido com desenvolvimento embrionológico, uma vez que nesta fase são formados os órgãos componentes do seu organismo. Possivelmente isto confere maior determinação (canalização de desenvolvimento) às células vegetais e o retorno ao estado embrionário de uma célula animal adulta somente ocorre por meio da transferência nuclear que gerou a clonagem da ovelha Dolly (Fig. 4). Ao contrário, no desenvolvimento embrionário de plantas superiores a maior parte dos sistemas de tecidos e órgãos não estão presentes. Estes somente são formados depois da germinação e a longo da vida da planta através da diferenciação de uma linhagem de células embrionárias mantidas nos meristemas. Outro aspecto que diferencia a morfogênese animal da vegetal é que na primeira, as células, tornam-se direcionadas para um caminho particular e específico de desenvolvimento, enquanto que nas células vegetais este direcionamento pode ser reversível. Toda a célula nucleada, mesmo diferenciada, pode ser induzida à uma re-entrada no ciclo mitótico, desde que ativada com o sinal adequado. Em células animais, portanto, a totipotencialidade encontra-se restrita a uma fase específica e limitada do desenvolvimento embrionário. A migração celular é componente importante da morfogênese animal. Células animais possuem motilidade e migram em direções definidas de acordo com as informações recebidas de outras células. Por sua vez, a rota de desenvolvimento de uma célula vegetal é determinada pela sua posição na estrutura da planta. Não apresentando mobilidade, a posição das células vegetais é determinada pelos planos de divisão da célula-mãe. Mesmo considerando que as interações entre as células têm papel fundamental na morfogênese animal e vegetal, a natureza das informações trocadas é mais limitada em plantas do que em animais.

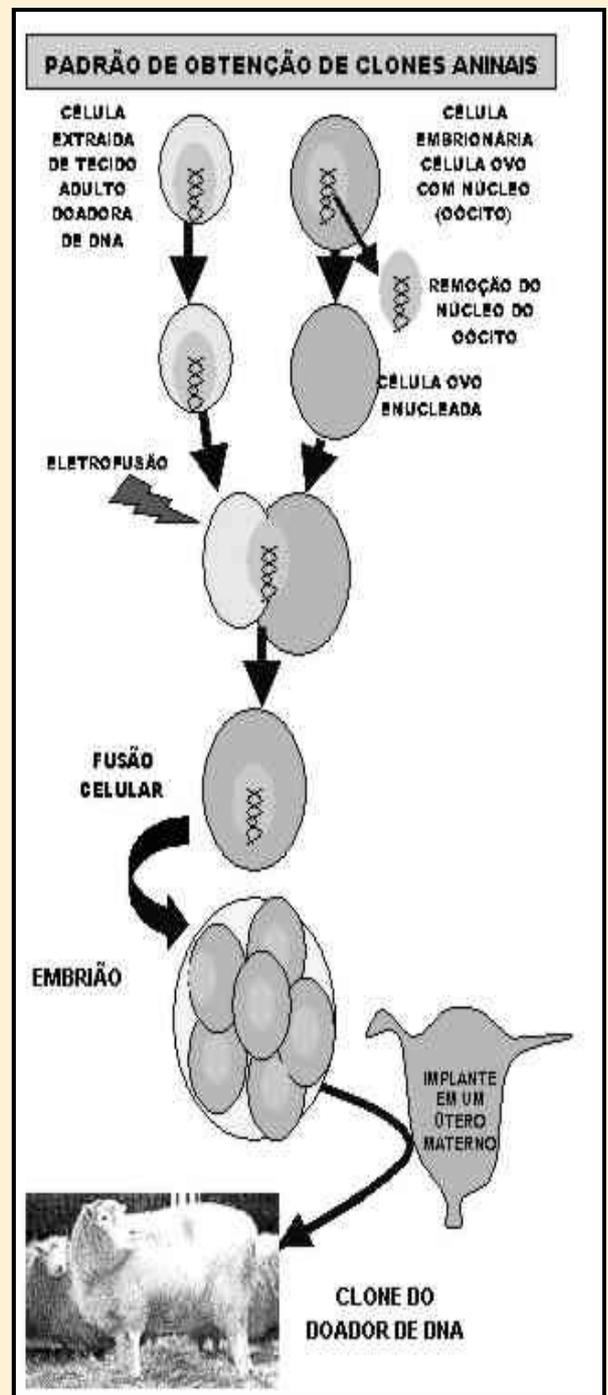


Figura 04 – Processo de obtenção de clones animais

4 MEIOS DE CULTIVO

4.1. INTRODUÇÃO

Meios de cultivo são combinações de sais minerais (macro e micronutrientes), carboidratos, vitaminas e reguladores de crescimento. Podem ser sólidos (adicionando-se ágar ou outro agente para geleificação) ou líquidos, de acordo com o protocolo para o sistema de cultivo. Os meios nutritivos utilizados para as culturas fornecem as substâncias essenciais para o desenvolvimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão do desenvolvimento in vitro (Torres, 1998). A constituição do meio é baseada nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender em necessidades específicas. Um dos primeiros meios de cultura desenvolvidos foi o de White (1942). Esse meio apresenta baixo nível de nitrogênio e de potássio, restringindo o seu uso para muitas células; entretanto, esta formulação com baixa concentração em sais, é usada em muitas situações. O meio MS (Murashige e Skoog, 1962) foi uma das primeiras formulações melhoradas usadas em cultura de tecidos de plantas, apresentando altos níveis de nitrato, potássio e amônio.

4.2. COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

Os meios nutritivos são formados por múltiplos componentes, sendo bastante variáveis em função da espécie vegetal e da origem do explante. É constituído de componentes essenciais e opcionais. Os essenciais compreendem a água, os sais inorgânicos, a fonte de carbono e energia, vitaminas e substâncias reguladoras de crescimento. Entre os componentes adicionais estão incluídos os aminoácidos e amidas, ácidos orgânicos e substâncias naturais complexas. Os principais componentes de uso mais freqüente nos meios de cultura são:

4.2.1 Água

É o componente em maior quantidade do meio de cultura. A qualidade da água é muito importante em cultura de tecidos vegetais. Pode ser uma fonte potencial de impurezas. Para melhor controle deve-se usar água destilada, bidestilada e deionizada. A utilização de água de torneira pode comprometer o desenvolvimento da cultura.

Em alguns explantes como calos de fumo a quantidade de água pode ser limitante para o desenvolvimento normal (Linsmaier & Skoog, 1965; Torres, 1998).

4.2.2 Nutrição mineral

Os nutrientes empregados nos meios de cultura são os mesmo estabelecidos para a nutrição mineral básica das plantas no campo. São eles:

- a) **Nitrogênio:** pode ser acrescentado aos meios na forma orgânica (prontamente disponível as culturas) ou na forma mineral. Na forma pode estar disponível como amônio (cátion) ou nitrato, nitrato (ânion), ou ainda na forma de compostos orgânicos, dependendo do material em cultura (George, 1993). É constituinte de aminoácidos, nucleotídeos e coenzimas, tendo importância na síntese protéica. A toxicidade do amônio às células diminui ou desaparece quando ele é usado como única fonte de nitrogênio na forma de sal de um ácido orgânico, de preferência um ácido tricarbóxico (ciclo de Krebs), como ácido cítrico ou ácido alfa-cetoglutarico (Torres, 1998). A glutamina (precursora de vários aminoácidos) é a mais utilizada como fonte de nitrogênio orgânico. Meios enriquecidos com nitrogênio são fundamentais para a embriogênese somática, bem como diferenciação de parte aérea (Amirato, et. al. 1983).
- b) **Fósforo:** é adicionado ao meio, principalmente, como fosfato de potássio monobásico ($H_2PO_4^-$), pois é a forma que é absorvido (George, 1993). O fosfato monobásico no meio MS é utilizado na concentração de 1,25 mM. Algumas fontes orgânicas podem ser utilizadas quando existem restrições aos fosfatos minerais (Torres, 1998). Atua no metabolismo energético, na regulação de processos enzimáticos e na ativação de enzimas (Santiago, 2001). Necessário para a síntese do ATP e na organogênese está envolvido na diferenciação da parte aérea, pois reverte o efeito das auxinas.
- c) **Potássio:** é usado na forma de nitrato, fosfato ou cloreto. Ativador de várias enzimas do metabolismo de carboidratos e proteínas. Uma das mais importantes é a quinase do piruvato, enzima envolvida nos processos de glicólise e respiração (Santiago, 2001). É necessário para a embriogênese somática (Amirato, 1983). A deficiência de potássio pode conduzir a hiperhidricidade e decréscimo na taxa de absorção de fosfato.
- d) **Enxofre:** utilizado na forma de sulfato ou na forma de aminoácidos (cistina, cisteína e metionina). Envolvido no metabolismo energético na formação do fosfosulfato de adenosina, constituinte da tiamina, biotina e coenzima A. Sua absorção é relacionada à assimilação do nitrogênio e, independentemente, do pH (Santiago, 2001).
- e) **Cálcio:** usado na forma de nitrato ou cloreto. Está envolvido na divisão celular, uma vez que um dos componentes da lamela média é o pectato de cálcio. Mantém a integridade da membrana celular e é importante para a germinação de grãos de pólen (George, 1993). É um agente quimiotrófico para o direcionamento do tubo polínico. Altas concentrações de cálcio (6 a 9 mM) são necessárias para controle da necrose do ápice caulinar. Pode ter limitações na translocação entre as células.
- f) **Magnésio:** usado na forma de sulfato de magnésio. É um dos componentes da clorofila; co-fator importante para várias reações enzimáticas que atuam sobre substratos fosforilados.
- g) **Carbono:** é uma fonte importante de energia é a forma o esqueleto de todos os compostos orgânicos. A suplementação geralmente é pela adição de açúcar na forma de sacarose, glicose, frutose e outras.
- h) **Ferro:** está numa faixa intermediária entre os macros e micronutrientes. É adicionado ao meio na forma quelato Fe-EDTA. Envolvido nas reações de oxi-redução nos organismos vivos. Essencial para a síntese da clorofila, é integrante do grupo protéico (heme) das porfirinas.

- j) Molibidênio:** é adicionado na forma de molibdato de sódio (Na_2MoO_4). Co-fator da redutase do nitrato.
- k) Cobre:** é usado como sulfato de cobre. É um cátion que em dose acima do normal é fitotóxico às culturas. Constituinte da enzima plastocianina que é importante componente do transporte de elétrons.
- l) Cloro:** é essencial para a fotossíntese, sendo requerido durante a reação de Hill.
- m) Zinco:** sulfato de zinco. Importante nas reações de oxi-redução das plantas. Co-fator de enzimas anidrase carbônica.
- n) Manganês:** sulfato de manganês. Essencial no metabolismo para a reação de Hill na fotossíntese, quando a molécula de água é quebrada produzindo elétrons e oxigênio.
- o) Cobalto:** é usado como cloreto de cobalto e está envolvido na expansão foliar.

4.2.3. Constituintes orgânicos

Os compostos orgânicos importantes são os carboidratos, substâncias reguladoras de crescimento, vitaminas, aminoácidos e amidas, certas purinas e pirimidinas, hexitóis e ácidos orgânicos.

a) Carboidratos

As células, tecidos e plântulas cultivadas in vitro não encontram condições adequadas de iluminação e concentração de CO_2 e, as vezes, não apresentam teores de clorofila suficientes para realizar fotossíntese (Torres, 1998). Muitas vezes, açúcares que não são efetivos na manutenção do crescimento do calo, sustentam a iniciação de brotações adventícias e a embriogênese somática.

Os carboidratos mais usados nos meios de cultura são a sacarose, a glicose e a frutose nos níveis de 2% a 5% (p/p) (George, 1993). A concentração de 3% é a mais usada. Concentrações de sacarose entre 6% a 12% podem ser usadas em cultura de embriões, frutos e anteras, enquanto que o nível de 1,5% é usado em cultura de protoplastos.

Pode ocorrer a caramelização do açúcar quando exceder o tempo de autoclavagem e a sua degradação pode ocorrer a formação de hidroxiacetonas, dihidroxiacetona, furano, 2-metilfurano, 2,5-dimetilfurano e maltol (Ammirato et. al. 1983). Estes compostos formam meladoidinas que são compostos de coloração amarronzada, de alto peso molecular, podendo inibir o crescimento celular. O açúcar é purificado com acetato, para precipitar impurezas e pode conter alto nível de zinco que é tóxico para o tecido.

Glicose e frutose devem ser esterilizadas a frio.

b) Aminoácidos e amidas

A suplementação pode ser realizada pela inclusão de uma proteína hidrolisada ao meio. Qualquer efeito benéfico pode ser avaliado pela substituição desta proteína por uma mistura de aminoácidos e amidas. Os aminoácidos e amidas têm importância na amplificação das respostas morfogenéticas, proporcionando maior crescimento e facilitando a diferenciação no sentido da regeneração. As formas "L" dos aminoácidos são de ocorrência natural. A tirosina apresenta influência na iniciação de parte aérea em cultura de calos, L-arginina no enraizamento e L-serina na obtenção de embriões haplóides mediante o cultivo de micrósporo. As amidas L-glutamina e L-asparagina são benéficas na obtenção de embriões somáticos, e a cisteína é incluída, às vezes, como agente redutor.

c) Vitaminas

Vitaminas são compostos orgânicos que, em baixas concentrações, desempenham funções reguladoras catalíticas no metabolismo celular. A vitamina mais comumente usada em cultura de tecidos é a tiamina (B1). A tiamina é solúvel em água. Outras vitaminas utilizadas incluem ácido nicotínico (B3) e piridoxina (B6). Embora as vitaminas sejam adicionadas ao meio antes da autoclavagem, a esterilização a frio é recomendada.

- **Vitamina A:** não utilizada no meio pois, ainda não foi encontrada nas plantas.
- **Riboflavina (Vit. B2):** componente da coenzima FMN (Flavina mononucleotídeo) e o FAD (Flavina-adenina-dinucleotídeo) que atuam em oxidações biológicas. Na fotossíntese FMN participa do transporte de elétrons (George, 1996).
- **Tiamina (Vit. B1):** atua no metabolismo celular devido à função como coenzima na descarboxilação dos cetoácidos. Ex: Piruvato e cetoglutarato (George, 1996).
- **Ácido pantotênico:** É um dos componentes da coenzima A e exerce papel importante no metabolismo de lipídios.

- **Ácido nicotínico (Niacina ou Vitamina B3):** É um componente das coenzimas NAD e NADP importantes na transferência de hidrogênio.
- **Piridoxina, Piridoxal e Piridoxamina (complexo vit. B6):** Fazem parte de coenzima metabólicas de aminoácidos. Estas vitaminas têm papel importante nas reações de transaminação e descarboxilação (George, 1996).
- **Biotina:** atua no metabolismo do ácido aspártico, e nas reações do ciclo de Krebs que levam à formação deste ácido (Ammirato, 1983).
- **Ácido ascórbico (vitamina C):** Catalisador de fosforilação fotossintética devido ao poder de oxidar e reduzir facilmente (Santiago, 2001).

d) Outros suplementos orgânicos

- Misturas complexas:

São preparações obtidas de produtos naturais, de composição indefinida, que servem para enriquecer o meio de cultivo. A composição destes produtos é de difícil determinação e de uso restrito a algumas culturas e de difícil repetição experimental, quando as tentativas de adequação não forem suficientes para promover determinado processo morfogênético. Em trabalhos de rotina, estas preparações podem ser usadas caso estimulem respostas desejadas.

- **Proteínas hidrolisadas:** a mais comum é a caseína hidrolisada, por ser importante fonte de aminoácidos. Outras também são utilizadas: lacto-albumina hidrolisada, triptona, peptona, etc.
- **Suco de laranja, tomate e outros:** contém ácido cítrico e outras substâncias de crescimento não identificadas.
- **Leite de coco:** É o endosperma de *Cocos nucifera* na fase líquida ou gelatinosa. É um suplemento bastante usado. Recomenda-se que seja esterilizado a frio.
- **Extrato de leveduras:** É fonte de aminoácidos e vitaminas.
- **Polpa de Banana:** usada na suplementação do meio de cultura de orquídeas.

- Hexitóis:

Os hexitóis são compostos cíclicos com grupos –OH em todos os seis carbonos. O mais usado é o inositol, myo-inositol é a forma inativa e i-inositol é a ativa. O meso-inositol é uma mistura das formas d e l. O inositol é considerado estimulador de processos de crescimento *in vitro* e pode servir como fonte de carboidrato. Desempenha papel importante na biossíntese do ciclitol, no armazenamento de compostos polihídricos como reserva, na germinação de sementes, no transporte de açúcar, na nutrição mineral, no metabolismo de carboidratos, na estrutura de membranas, formação de parede celular, homeostase de hormônios e no estresse fisiológico (Santiago et. al. 2001).

- Compostos fenólicos:

São compostos derivados de fenólicos (mono-OH) e atuam em processos que promovem o desenvolvimento aéreo enquanto que os derivados fenólicos (bi-OH) estão envolvidos com a iniciação de raízes (George, 1996). Estas substâncias atuam na degradação oxidativa do AIA. Por outro lado, compostos fenólicos (bi-OH) inibem a degradação oxidativa do AIA, tendo efeito benéfico no enraizamento (Santiago et. al. 2001).

- Ácidos orgânicos:

A adição de ácidos de compostos intermediários do ciclo de Krebs, tais como malato ou citrato, é comum em meio destinado à cultura de protoplastos (Santiago, 2001). Estes compostos parecem estar envolvidos na minimização do efeito inibidor da amônia. Por serem soluções antioxidantes são preparadas usando uma mistura de 100 mg de ácido ascórbico e 150 mg de ácido cítrico, dissolvido em 1 litro de água e sua esterilização é feita em filtro bacteriológico de 0,22 ou 0,45 micras (Ammirato, 1983; Santiago, 2001). O ácido ascórbico e o ácido cítrico são usados para prevenir o escurecimento de tecidos excisados de plantas.

- Purinas e Pirimidinas:

A concentração mais usada varia de 40 a 160 mg/L. As bases nitrogenadas citosina e guanina podem também promover o crescimento de cultura de calo. A adenina ou o sulfato de adenina estimulam o crescimento de brotações *in vitro*.

4.2.3. Reguladores do crescimento vegetal

Para ocorrer o desenvolvimento ou a entrada de atividade de um determinado processo é necessário a sinalização específica por reguladores de crescimento em sítios regulador por kinases.

O controle químico da diferenciação da parte aérea foi primeiramente observado em cultura de calo de tabaco. Foi observada inibição na formação de gemas por auxinas, e reversão deste efeito estimulando brotações utilizando-se adenina bem como o fosfato inorgânico. Esta foi a constatação de que o processo de organogênese in vitro é controlado por substâncias hormonais sendo que o desenvolvimento de parte aérea, raiz ou calo é determinado pelo balanço entre auxinas e citocininas.

O balanço de auxinas/citocininas em alto/baixo favorecem o enraizamento e o balanço inverso promove a formação de parte aérea. Concentrações iguais promovem a produção de calos.

As auxinas nos meios variam de 0,01 a 10 mg/L. As auxinas mais usadas são AIA (ácido indol-3-acético), AIB (ácido indol-3-butírico), ANA, 2,4-D, 2,4,5-T, 4-CPA e picloran. A auxina 2,4-D é bastante usada para a indução de calos e tem o efeito de supressão da morfogênese. As auxinas 2,4-D e ANA são sintéticas e têm efeitos semelhantes às auxinas de ocorrências naturais, sendo mais estáveis à degradação. A auxina 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) e o picloran induzem a formação de calos em monocotiledôneas (Ammirato, 1983). As auxinas são termo-estáveis, não decompondo quando autoclavadas. O AIA é a auxina natural e a menos estável, sendo destruído em pH baixo.

A não ser o 2,4 D e ANA, as soluções estoques não devem ser armazenadas por mais de uma semana. A dissolução das auxinas é feita em NaOH 1N. Utiliza-se 0,3 mL desta base para dissolver 10 mg de auxina.

As citocininas são derivadas da adenina (aminopurina) e têm um papel fundamental na diferenciação e regeneração de plantas na maioria das espécies (Santiago, 2001). Induzem a divisão celular, proliferação e morfogênese da parte aérea. As citocininas mais usadas em cultura de tecidos são a cinetina (CIN), benziladenina (BA), zeatina (Zea), isopentenil adenina (2ip) e thidiazuron (TDZ).

O ácido giberélico (GA3) é usado, algumas vezes, em cultura de meristemas, na recuperação de plantas livres de vírus. O GA3 deve ser dissolvido em água com pH ajustado a 5,7 ou em base (NaOH 1N). As soluções de GA3 devem ser esterilizadas em filtro bacteriológico uma vez que esta substância se decompõe por autoclavagem. As soluções estoques devem ser preparadas na hora.

O ácido abscísico (ABA) está envolvido na dormência e abscisão de folhas e frutos. Na cultura de tecidos o papel deste composto está envolvido principalmente na maturação de embriões obtidos na embriogênese somática. Este composto é termo-estável e fotossensível, recomenda-

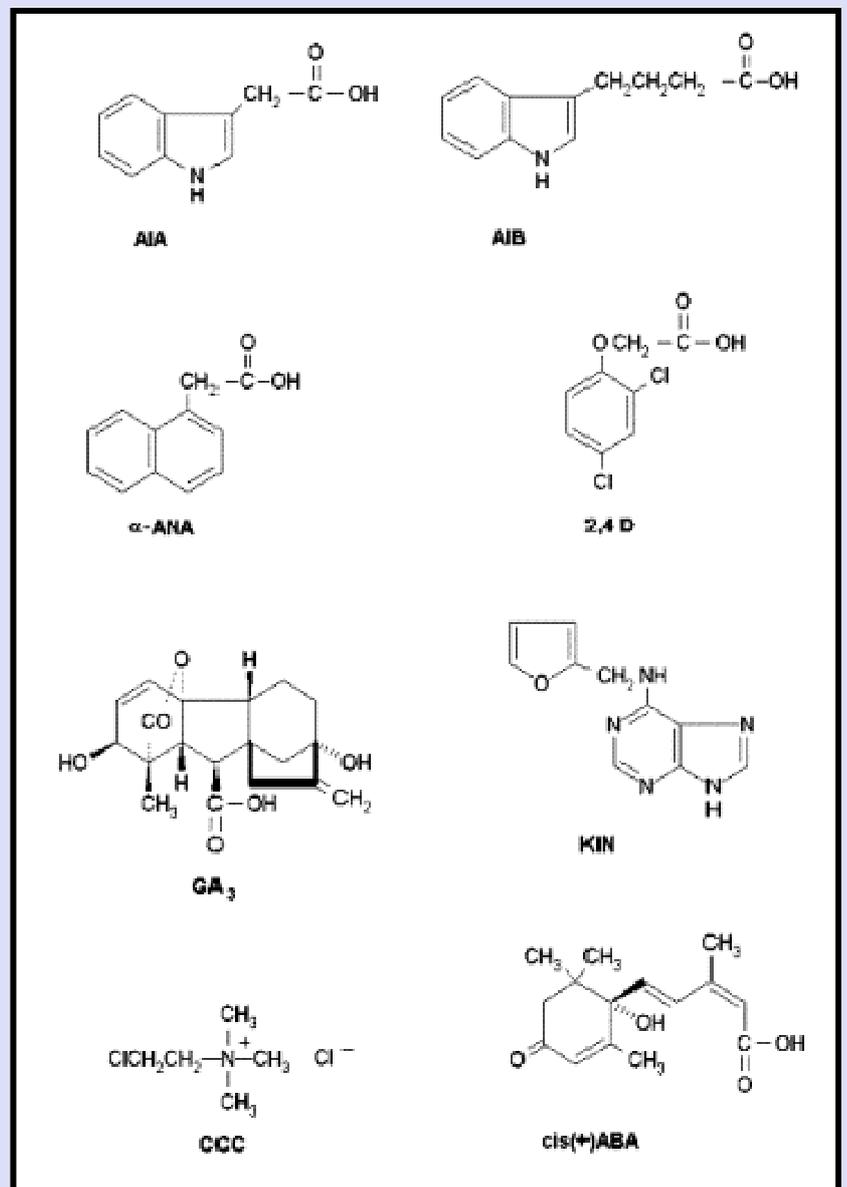


Figura 06 – Estrutura química dos principais reguladores de crescimento vegetal.

4.2.4. pH

O pH dos meios nutritivos em culturas de células vegetais é normalmente ajustado com HCl ou NaOH, depois de adicionar todos os componentes para um valor ligeiramente ácido, entre 5 e 6 (normalmente 5,8)(Torres, 1998). Recomenda-se este valor para formulações líquidas. Em meios gelificados com ágar, o pH deve ser ajustado em 5,7, pois em pH 5,0, ocorre a hidrólise de polissacarídeos, enquanto que em pH 6,0-6,2 verifica-se a precipitação de sais (George, 1996). No ajuste do pH, lava-se primeiramente o eletrôdo e, em seguida, faz-se a leitura em tampão 4,0. Posteriormente lava-se o eletrôdo e desta maneira o potenciômetro estará calibrado para uso. O pH varia durante o período de cultura.

4.2.5. Materiais de suporte

a) Ágar

Ágar é um polissacarídeo obtido pela purificação de algas marinhas. A concentração usada varia de 0,6% a 1% (de 6 a 10 g/L). O ágar impuro é constituído de polissacarídeos, aminoácidos, sais, açúcar, etc., devendo ser lavado em água destilada antes de ser usado. O ágar é alcalino, líquido à temperatura de 80°C e se solidifica à 40°C. É necessário a aquisição de ágar de boa qualidade, pois podem ser tóxicos em algumas condições de cultivo (Guerra, 2002).

Outros produtos gelificantes são Gelrite (Calbiochem) e Phytigel (Sigma). São mais puros que o ágar e provenientes de fermentações bacterianas (George, 1996). Usados na concentração de 0,2% (2 g/L). Citam-se que estes produtos podem causar vitrificação em algumas espécies.

Alguns laboratórios fazem o uso de polvilho de mandioca ou de milho (maizena) como gelificantes, porém apresentam restrições quanto a longevidade por degradar ao longo do cultivo.

b) pontes de papel

Em muitas cultura não é possível utilizar agentes geleificantes ao meio e também não é possível o uso em imersão em meios líquidos, nestes casos então, usa-se pontes de papel com meios líquidos. Utilizado principalmente no resgate de embriões imaturos e no cultivo de ovários.

c) Outros produtos: poliacrilamida, sílica gel e papel de filtro.

4.2.6 – Carvão ativado

É um pó bastante fino e de cor escura, sendo utilizado para eliminar substâncias tóxicas produzidas pelo explante. Concentrações em torno de 0,3% são usadas quando se deseja enraizamento in vitro, pois auxiliam na ação das auxinas e promovem a fixação dos compostos fenólicos produzidos pelo explante. Sugere-se, em alguns casos, aumento da concentração de auxina, quando na presença de carvão ativado. A pureza deste produto é variável.

4.3 PREPARAÇÃO DOS MEIOS

O preparo de soluções estoque tem por objetivo facilitar o preparo final dos meios de cultivo e precisão na dosagem dos componentes.

Normalmente se mantém os macronutrientes em soluções estoque em concentrações 10 vezes superior ao da concentração final (Torres, 1998). Para os micronutrientes as soluções estoques são de 1000 vezes superior. Para o quelato EDTA Fé a solução estoque é de 50 vezes. As porções são mantidas em geladeira e por um período não superior a uma semana para a maioria das soluções estoques, principalmente aquelas que apresentam precipitação.

Soluções estoques de vitaminas devem ser mantidas em geladeira ou em congeladores.

Recomenda-se montar estoques de sais minerais (conjuntos de macronutrientes e micronutrientes), Fe EDTA, misturas orgânicas e reguladores de crescimento.

A sacarose e o mio-inositol são pesados e preparados no momento do preparo do meio.

4.4. QUANTIDADE DE MEIO

Como regra geral, quanto menor o explante, menor a quantidade de meio a ser utilizado. Devem ser considerados principalmente as exigências de luminosidade, temperatura, trocas gasosas e acúmulo de produtos tóxicos no meio, que serão discutidas na morfogênese.

4.5. DESINFETANTES E ESTERILIZAÇÃO DO MEIO DE CULTURA

Os desinfetantes mais comumente usados em cultura de tecidos de plantas estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Desinfetantes mais comumente usados em cultura de tecidos de plantas. (Extraído do Catálogo da Sigma).

Desinfetante	Concentração(%)	Exposição (min.)
Hipoclorito de Cálcio	9-10	5-30
Hipoclorito de Sódio	0,5-5,0	5-30
Água Oxigenada	3-12	5- 15
Álcool etílico	70-95	5- 15
Nitrato de prata	1	5-30
Cloreto de mercúrio	0,1-1,0	2-10

Tabela 3: Período mínimo recomendado para esterilização de meio para cultura de tecidos de plantas. (Extraído do Catálogo da Sigma).

Volume por recipiente (ml)	Tempo de autoclavagem (min.)
25	20
50	25
100	28
250	31
500	35
1000	40
2000	48
4000	63

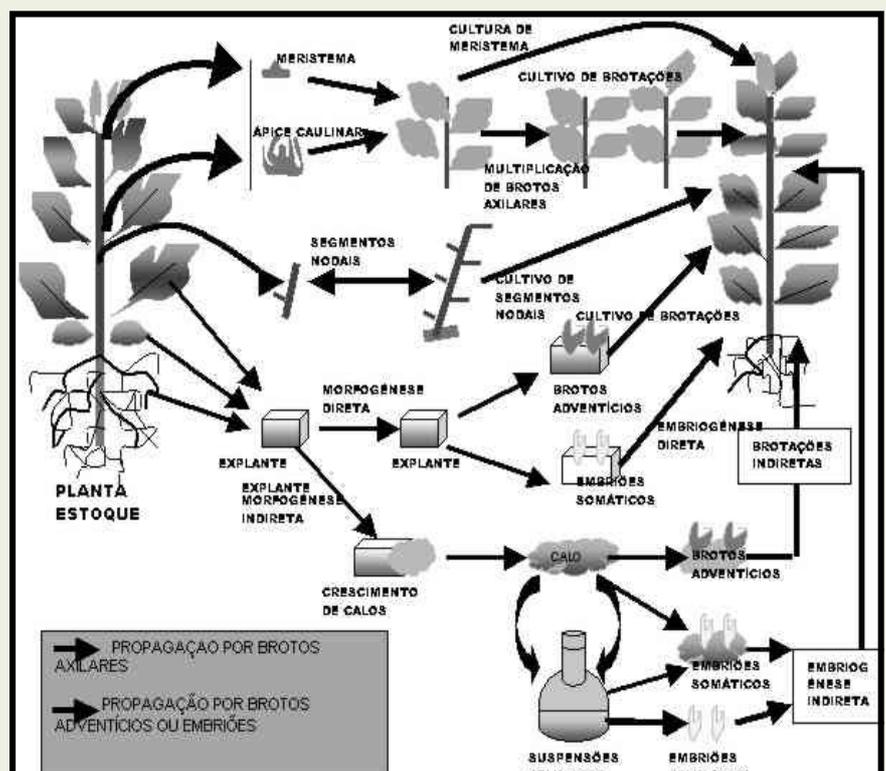
121°C e 1,05kg/cm/cm² = 105kPa

5. PADRÕES MORFOGENÉTICOS IN VITRO

A possibilidade de manipulação da morfogênese relaciona-se com a exata compreensão dos conceitos enunciados anteriormente. Desta forma, tecidos, órgãos ou células com intensidades variadas de determinação podem adquirir novas competências através da ação de determinados sinais químicos (reguladores de crescimento) que ativam seletivamente determinados genes (epigênese). A resposta final é a expressão morfogenética em dois níveis básicos: organogênese e embriogênese somática.

Uma representação esquemática das rotas e sistemas de regeneração in vitro é apresentada na figura

Figura 07 – Principais métodos de micropropagação e as rotas de crescimento vegetal dos explantes. (Adaptado de George, 1996)



5.1. ORGANOGÊNESE

A organogênese relaciona-se com a obtenção de eixos caulinares monopolares originados de gemas pré-existentes ou neoformadas. Estes eixos caulinares são induzidos ao enraizamento in vitro ou ex vitro resultando em plântulas completas que podem ser então aclimatizadas. A organogênese pode ser direta ou indireta. No primeiro caso, a partir de um explante primário há a formação de um eixo caulinar a partir de gemas apicais, laterais ou axilares. No segundo caso ocorre a desdiferenciação do explante, resultando na formação de calos, que podem ser definidos como a proliferação de células não diferenciadas massas, originado meristemóides (Thorpe, 1980). Para finalidades de micropropagação clonal a formação de calos é indesejável uma vez que a constituição cromossômica deste material é, em geral, instável, podendo originar variantes genéticas, por meio de um processo chamado variação somaclonal (Larkin & Scowcroft, 1981). Neste caso, o período de crescimento desorganizado deve ser o menor possível, ou preferencialmente eliminado (Street, 1975; Murashige, 1977).

A possibilidade de manipulação da organogênese depende do tipo e concentração relativa dos reguladores de crescimento, como indicado pelo já clássico trabalho de Skoog e Miller (1957). Estes autores observaram que a relação entre a auxina e a citocinina no meio de cultura era responsável pela resposta organogenética em tecidos medulares de tabaco. Desta forma meios de cultura contendo concentrações mais elevadas de citocininas promoviam a formação de brotações aéreas ou eixos caulinares; meios de cultura contendo níveis mais elevados de auxinas induziam a formação de raízes e em concentrações equimolares destes reguladores de crescimento verificava-se a formação de calos.

A seleção de uma planta matriz e de um explante adequado é condição fundamental para orientar os padrões de morfogênese (Thorpe, 1980). Murashige (1974) discutiu os vários fatores que devem ser considerados nesta seleção, tais como o órgão da planta a ser utilizado como fonte de explante, a idade fisiológica, a época do ano em que é feita a coleta e as condições gerais da planta doadora.

5.1.1. SISTEMAS ORGANOGENÉTICOS

O termo cultura de órgãos é usado para todos os tipos de cultura nos quais uma forma organizada de crescimento pode ser continuamente mantida. Inclui o isolamento asséptico de estruturas definidas como primórdio foliar, flores imaturas e frutos, e seu crescimento in vitro. Para a micropropagação os mais importantes tipos de culturas de órgãos são:

a) Cultura de meristema

Consiste no estabelecimento do domo meristemático apical sem os primórdios foliares. A brotação apical tipicamente cresce, originando um único broto.

b) Cultura de ápices caulinares

É o estabelecimento in vitro a partir de brotações apicais maiores do que aquelas utilizadas para iniciar a cultura de meristema, tendo alguns primórdios foliares. Essas brotações apicais podem produzir múltiplas brotações.

c) Cultura de segmentos nodais

Os segmentos nodais são constituídos de gemas laterais isoladas, segmentos de caule com uma ou múltiplas gemas. Cada gema desenvolve para formar uma única brotação.

d) Cultura de embriões

É iniciada a partir de embriões zigóticos extraídos de sementes. Os embriões germinam originando brotos.

A cultura de meristema e a cultura de embriões são descritos com mais detalhes a seguir.

5.1.1. Cultura de meristemas apicais

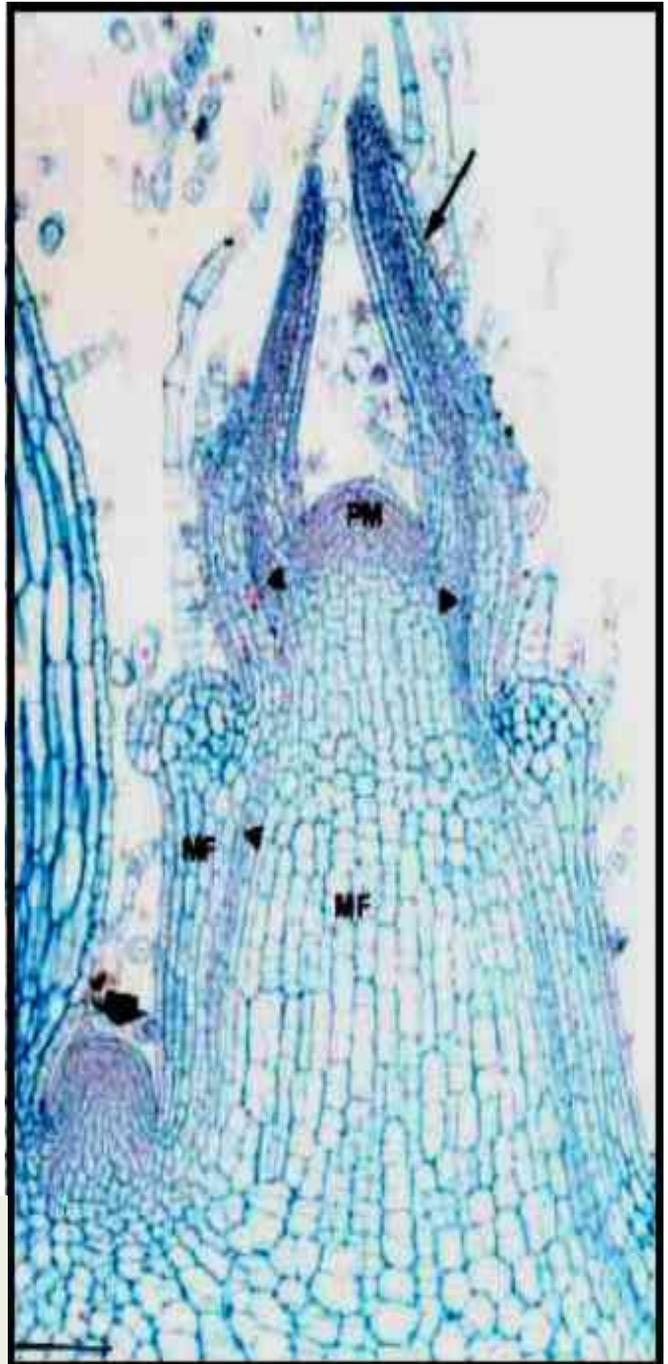
Esta técnica compreende o isolamento e a inoculação do domo apical e alguns primórdios foliares, ou do meristema (figura 5) isoladamente (0,10 a 0,20 mm de comprimento). Usualmente, a cultura de meristema refere-se ao crescimento do domo apical da brotação, excluindo as folhas primordiais. O meristema não apresenta folíolos, sendo constituído por duas regiões diferentes, túnica e corpus. A túnica é constituída de uma a três camadas de células, a mais interna forma a epiderme e as outras duas restantes dão origem a folha ou somente a epiderme foliar.

O corpus é a camada mais interna, responsável pela formação do restante da planta. O plano de divisão da túnica é anticlinal e do corpus é periclinal. O objetivo neste caso é a produção de uma microplanta enraizada que deve ser livre de vírus, fungos e bactérias. Quanto menor for o explante mais efetiva será a eliminação de patógenos. Esta técnica tem obtido sucesso com muitas plantas herbáceas exploradas economicamente, como cravo, crisântemo, batatinha, batata-doce, mandioca, banana. No caso do morango a simples utilização de mudas obtidas por cultura de meristemas propiciou um aumento na produtividade de 3 para 12 t/ha em lavouras do RS (Peters, 1986). Atualmente com a introdução de tecnologias adicionais na cadeia produtiva do morango, já são obtidas produtividades de até 80 t/ha, em cultivos no RS, SC e SP. Para plantas lenhosas a cultura de meristemas apresenta algumas dificuldades havendo a necessidade de utilização de técnicas auxiliares como a microenxertia (Hartmann et al., 1990).

A história da erradicação na cultura de tecidos de vírus iniciou em 1934 quando White observou que subcultivos de segmentos de raízes de plantas infectadas por vírus, levavam à sua eliminação. Observou-se posteriormente que a gema apical de crescimento também se encontrava livre de vírus. Morel e Martin Lo, na década de 40, cultivaram meristemas caulinares de plantas infectadas, obtendo sucesso. Hoje esta técnica é universalmente utilizada e apresenta grande impacto na produção agrícola vegetal.

Em uma planta infectada, a concentração de vírus não é uniforme e é maior em tecidos maduros e menor em tecidos meristemáticos. Na primavera quando o crescimento é intenso, os meristemas alongam-se rapidamente e a concentração de vírus é menor.

Figura 09 - Secção longitudinal do meristema apical do caule de *Coleus* sp. Seta grossa = gema axilar; seta fina = protoderme; cabeça de seta = procâmbio; MF = meristema fundamental; PM = promeristema. Barra = 500 μ m. (Apezato, 2003).



Estudos demonstram que plantas obtidas por cultura de tecidos estão livres de vírus. A hipótese mais aceita para a ausência de vírus nestes tecidos diz que a interrupção temporal da organização normal dos tecidos meristemáticos, ocasiona uma inibição da multiplicação do vírus devido à não disponibilidade de enzimas-chaves. Esta hipótese do efeito da desorganização celular foi reforçada pela presença de baixas concentrações de vírus em calos friáveis de tabaco, quando comparados com calos compactos e com maiores níveis de organização. Além disso, a ausência de tecido vascular na região do meristema apical, a presença de conexões plasmodesmáticas em dimensões diminutas nestas células e o ritmo ativo de divisões celulares nesta região, também são fatores que podem explicar a baixa concentração ou a ausência de vírus nestas células. O processo ativo de divisão celular poderia utilizar a maior parte da energia para a formação de macromoléculas e componentes celulares estruturais, deixando os vírus em condições pouco competitivas para a própria multiplicação. Comprovou-se também que a concentração de vírus aumenta na região sub-apical dos meristemas de plantas tratadas com substâncias inibidoras de crescimento, as quais reduzem as taxas de divisão celular.

Em resumo, a inexistência de vírus nos meristemas apicais pode ser atribuída aos seguintes aspectos:

a) O domo apical mantém certa distância das terminações vasculares e, nestas condições os vírus necessitariam passar de célula a célula até o domo apical;

- b) Quando as células meristemáticas do domo apical estão em divisão ativa, o RNA do vírus não consegue introduzir-se no genoma destas células;
- c) Células meristemáticas podem ter sistemas químicos de inativação, que podem ser potencializados em meristemas isolados;
- d) Altas concentrações de auxinas presentes nos meristemas caulinares seriam responsáveis pela ausência de vírus.

A propagação massal das plantas isentas de viroses poderá ser feita através de outras técnicas como as que são descritas posteriormente.

5.5.1.1. Aplicações da cultura de meristema

A cultura de meristemas é utilizada para estudos do efeito de fitorreguladores na iniciação foliar e no estudo do florescimento, na propagação vegetativa para obtenção de plantas livres de patogênicos e, na multiplicação clonal rápida. Os meristemas são amplamente utilizados na limpeza pois estes materiais são livres de vírus. Isto é explicado pelos seguintes fatos:

- a) Crescimento contínuo do tecido. A divisão celular é intensa, o que aumenta a competição por metabólitos e desta forma o vírus não tem energia suficiente para sua multiplicação.
- b) Ausência do tecido vascular (floema e xilema) no meristema. É muito difícil a passagem do vírus célula a célula (o DNA do vírus é maior que o plasmodesmata).

Vários fatores são determinantes para se obter sucesso na limpeza. Dentre estes, pode-se destacar:

- Tamanho ideal do meristema: de 0,1 a 1 mm. Menor tamanho implica num maior sucesso na limpeza, mais a sobrevivência é menor;
- Localização do explante: explantes retirados da ponta do broto estão em um estágio mais jovem de desenvolvimento do que explantes da base;
- Época de coleta: os explantes devem ser de fase de crescimento ativo.

5.1.1.2. Proliferação de gemas axilares (segmentos nodais)

Esta técnica é fundamentada pela indução das gemas laterais existentes. Inclui o isolamento e a inoculação de segmentos nodais contendo gemas vegetativas axilares, propiciando a multiplicação direta (ausência de calo) de brotações que podem ser separadas em microestacas para enraizamento in vitro ou in vivo. Este procedimento pode originar respostas de propagação massal em progressão geométrica. Por ser um sistema direto, apresenta menores possibilidades de gerar variantes somaclonais. Um dos exemplos de utilização desta técnica é a propagação clonal do abacaxi através da liberação das gemas axilares. Atualmente é um sistema utilizado em laboratórios junto a viveiros comerciais de espécies lenhosas, pois é fácil de manipulação e de alta taxa de regeneração de explante. Além disso, o material vegetal mantém as características genéticas com quase ausência absoluta de variações epigenéticas.

5.1.2. INDUÇÃO E PROLIFERAÇÃO DE GEMAS ADVENTÍCIAS

Consiste na indução e formação direta ou indireta de meristemóides a partir de discos foliares, ápices caulinares ou radiculares, segmentos caulinares nodais e internodais, cotilédones, hipocótilos e outras estruturas de plântulas, segmentos de flores e inflorescências imaturas (monocotiledôneas: *Gladiolus*, *Hemerocallis*, *Iris*, *Freesia*; Dicotiledôneas: *Gerbera*, *Chrysanthemum*), escamas de bulbos (tecidos meristemáticos na placa basal). Neste modelo, a escolha do explante e o tipo e concentração do regulador de crescimento determinam o sucesso da iniciação das brotações adventícias. No caso de iniciação direta, algumas células parenquimáticas epidérmicas ou sub-epidérmicas tornam-se meristemáticas e grupos celulares (meristemóides) com forte reação a corantes específicos se desenvolvem. No modelo indireto ocorre a desdiferenciação das células parenquimáticas e a organização dos meristemóides e as brotações adventícias surgem a partir da periferia dos calos.

Este modelo organogenético resulta nas maiores taxas de multiplicação, sendo de uso mais geral e comum em plantas hortícolas. Por outro lado ele pode originar a produção de variantes ou quimeras por estar baseado na formação de calos. Outro uso frequente deste modelo é o co-cultivo com *Agrobacterium* em técnicas de transformação de plantas.

5.1.2. ESTÁGIOS E MODULAÇÃO DA ORGANOGÊNESE

A micropropagação de plantas através da cultura de tecidos pode ser operacionalizada em uma seqüência laboratorial de três estágios, cada qual apresentando objetivos, pressuposições e necessidades específicas em termos de composição dos meios de cultura, tipo e balanço dos reguladores de crescimento e condições físicas como luz, temperatura, foto período.

Em condições laboratoriais cada estágio deve ser identificado e as condições ótimas devem ser estabelecidas (Murashige 1974). Debergh e Read (1991) propuseram a inclusão do estágio 0 nesta seqüência de operações e, desta maneira, a indução e a expressão de respostas organogênicas in vitro deve obedecer aos passos listados a seguir:

Estágio 0 - Consiste em selecionar e cultivar a planta matriz doadora de explantes em condições adequadas e, eventualmente, controladas. Isto significa que pode ser necessário modificar as condições de fotoperíodo e temperatura, ou aplicar a essa planta fitorreguladores do grupo das giberelinas e auxinas, alterando com isto a sua condição fisiológica.

Estágio I - Consiste no estabelecimento da cultura asséptica. O objetivo deste estágio é a definição do tipo de explantes a ser utilizado, o estabelecimento de culturas isentas de microorganismos contaminantes, a obtenção de altos índices de sobrevivência e de rápido crescimento dos explantes. Neste estágio torna-se necessário monitorar e controlar as reações de oxidação que ocorrem: a) pela oxidação de compostos fenólicos presentes no explante, como resposta ao ferimento provocado pela excisão de um órgão ou tecido e; b) pela síntese de compostos mono e poliméricos por parte do explante. A incubação destas culturas na ausência da luz por alguns dias pode inibir os processos oxidativos.

Estágio II - Multiplicação: este estágio é fundamentado na divisão e diferenciação celular, objetivando a obtenção de uma plântula, de acordo com as diferentes rotas morfogênicas possíveis. De maneira geral procura-se promover a liberação de gemas axilares pré-formadas ou a indução de gemas adventícias. Em muitos casos estágios intermediários de calo estão envolvidos, contudo, quando o objetivo é a manutenção da conformidade clonal, a passagem por estágios de calo deve ser evitada, tendo em vista a possibilidade de ocorrência de variações somaclonais. Neste estágio deve-se determinar o número e intervalo de sub-cultivos, bem como determinar e otimizar a taxa de multiplicação, ou seja, o número de gemas ou de eixos caulinares que podem ser obtidos a partir de cada inóculo nos sub-cultivos. Para bananeira e abacaxizeiro, partindo-se de gemas apicais e laterais respectivamente, a taxa média de multiplicação é de 10 eixos caulinares a cada sub-cultivo realizado a cada 20 dias. A experiência adquirida com esses dois sistemas indica que podem ser efetuados cinco sub-cultivos com certa garantia de manutenção de fidelidade clonal. A partir deste sub-cultivo podem aparecer mutantes ou variantes somaclonais. No Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal do Depto. de Fitotecnia do CCA/UFSC, não foram observadas alterações morfológicas na organogênese do abacaxizeiro até o quinto sub-cultivo, a partir do qual se identificaram mutantes, na frequência de 1 para 700.

As condições ambientais neste estágio relacionam-se com a temperatura, cuja faixa ótima está entre 22 e 27°C para plantas de clima temperado e tropical, respectivamente. O período de luz deve permanecer em torno de 16 a 18 horas em intensidades luminosas médias de 5 W.m⁻².

Estágio III - Nesta fase busca-se o alongamento, a indução e iniciação radicular e a preparação para a aclimatização. O objetivo deste estágio é a preparação para a conversão das condições heterotróficas para autotróficas. As estratégias deste estágio incluem eventuais inclusões no meio de cultura de: a) GA3 para induzir o alongamento de eixos caulinares; b) AIB para induzir a iniciação radicular e; c) carvão ativado para favorecer a iniciação radicular. Reduções nas concentrações dos sais e das fontes de carboidratos do meio de cultura podem trazer benefícios à iniciação radicular, bem como facilitar o processo de aclimatização.

Tendo em vista que este estágio da cultura in vitro pode representar 30 a 60% do custo de uma planta micropropagada, muitos laboratórios preferem promover o enraizamento ex-vitro e esta estratégia deve ser considerada sempre que possível. O emprego da técnica da dupla-camada que consiste em adicionar uma pequena quantidade de AIB sobre a superfície do meio sólido, para que ocorra a indução radicular dos eixos caulinares tem gerado excelentes resultados em muitos sistemas.

Estágio IV - Aclimatização: Neste estágio ocorre a transição da condição heterotrófica para autotrófica. O principal objetivo neste estágio é diminuir ao máximo as perdas que ocorrem principalmente pela desidratação dos tecidos da microplanta. O emprego de estufas, túneis plásticos, sistemas de nebulização e de antitranspirantes deve ser considerado para cada situação, tendo em vista que as plantas neste estágio normalmente não apresentam estômatos funcionais e suas folhas tem reduzida capacidade de formação cutículas cerosas protetoras.

Composições adequadas de substratos também são importantes e na maior parte dos casos o emprego de areia, terra, vermiculita, casca de arroz carbonizada isoladamente ou em misturas proporcionais, resulta em elevados índices de sobrevivência.

De maneira geral este estágio inicia com a retirada das plântulas dos frascos e a cuidadosa remoção por lavagem de resíduos de meio de cultura solidificado junto ao sistema radicular. Um segundo passo consiste em repicar estas plântulas para bandejas de isopor contendo o substrato autoclavado, cuja composição foi previamente determinada. O terceiro passo consiste em manter estas bandejas, por períodos de até 15 dias, em sala de cultura cuja temperatura e duração e intensidade luminosa possam ser controladas. A manutenção de uma câmara úmida sobre as bandejas pode ser feita pela utilização de filmes plásticos em cobertura. Posteriormente, transfere-se esta bandeja para uma estufa com sistema de nebulização intermitente por períodos médios de 15 a 30 dias, podendo-se após, repicar estas plântulas para sacos plásticos contendo uma mistura convencional não autoclavada de solo argiloso, arenoso e matéria orgânica e mantê-las em condição de ripado ou cobertura com sombrite que deixem passar em torno de 50% da luminosidade. Por fim procede-se uma retirada gradual da cobertura para que as mudas sejam submetidas às condições normais que se verificam após o transplante para o local definitivo. É importante salientar que determinadas seqüências destas operações podem ser eliminadas em algumas espécies. Para abacaxizeiro, por exemplo, o segundo passo anteriormente descrito pode ser eliminado e não há a necessidade de ser feita a repicagem para sacos plásticos, podendo as mudas ser comercializadas ou enviadas ao campo nas bandejas de isopor. Torna-se necessário, portanto, estabelecer procedimentos específicos para cada espécie a ser trabalhada em um laboratório de micropropagação.

5.1.3. CULTURA DE EMBRIÕES

A cultura de embriões pode ser definida como o isolamento estéril e crescimento de um embrião imaturo ou maturo in vitro, com o objetivo de se obter uma planta viável.

Embriões zigóticos ou de sementes são frequentemente usados vantajosamente como explantes em cultura de tecidos, por exemplo, para iniciar a cultura de calo. Em cultura de embriões, entretanto, os embriões são retirados das sementes e são individualmente isolados e "germinados" in vitro desenvolvendo uma planta por explante. A cultura de embriões isolados pode ajudar na produção rápida de plântulas de sementes que apresentam dormência embrionária ou embrião imaturo.

5.1.3.1. Tipos de cultura de embriões:

a) Cultura de embrião imaturo

Originado de sementes imaturas, é usado para evitar o abortamento natural. É mais difícil, devido a excisão e meio de cultura mais complexo.

b) Cultura de embriões maduros

Originado de sementes maduras, é usado para evitar a inibição de germinação de semente.

5.1.3.2. Estádios de desenvolvimento do embrião

Quanto mais imaturo for o embrião maior será o requerimento nutricional. No estágio globular há requerimento de meios mais complexo (fitormônios, altas concentrações de açúcares, água de coco, etc.). Antes do formato de coração, os embriões são bastante heterogêneos, não sintetizando fitormônio ou mobilizando compostos de carbono.

No estádios heterotróficos, os embriões requerem sais, açúcares, vitaminas, nitrogênio, citocininas, auxinas, água de coco (algumas substâncias podem ser opcionais). Quando aumentam de tamanho, tornam-se autotróficos e neste estágio requerem um meio mais simples.

Os embriões geralmente requerem alta taxa de açúcar (fonte de carbono e agente osmótico), pois têm um potencial hídrico muito negativo (conteúdo alto de sólidos). Uma alternativa para resolver a dificuldade imposta pelo potencial hídrico do embrião é fixar a sacarose e elevar o teor de manitol (agente osmótico).

5.1.3.3 Fatores que afetam o sucesso da cultura de embrião

1) Genótipo: em algumas espécies o embrião cresce facilmente enquanto que em outras é muito difícil (há também diferenças entre cultivares de uma espécie).

2) Estádio de desenvolvimento do embrião no isolamento: é muito difícil desenvolver embrião muito pequeno in vitro.

3) Condição de crescimento da planta-mãe. crescer a planta-mãe em condições controladas resulta em um melhor desenvolvimento do endosperma, portanto melhora o crescimento do embrião isolado.

4) Composição do meio: embriões imaturos requerem uma composição mais crítica do que embriões maduros. Em ambos (maduro e imaturo) os macro e microelementos são importantes.

Os meios usados são sólidos: MS, White e 85, em uma faixa de pH entre 5 a 6. Carboidratos (sacarose, usada na concentração de 2-3% e 8-12% para embriões maduros e imaturos, respectivamente) são fontes de energia e também agem abaixando o potencial osmótico, especialmente em embrião jovens.

O ágar é usado em concentrações entre 0,6 a 0,8% (valores abaixo resultam em inibição de crescimento). Os reguladores de crescimento auxinas e citocininas geralmente não são usados. As vezes se utiliza giberelina. Substâncias de contribuição complexa como a água de coco são bastante utilizadas, especialmente para embriões imaturos.

5) Luz: fator pouco estudado. Algumas vezes mantém-se o embrião isolado no escuro por 7 a 14 dias.

6) Temperatura: a temperatura ótima é dependente da espécie, variando, geralmente entre 22 e 28°C).

5.1.3.4. Aplicações práticas da cultura de embriões

a) Eliminação da inibição (dormência) da germinação de semente

Em algumas espécies é absolutamente impossível obter a germinação in vivo devido a características genéticas ou fisiológicas.

b) Recuperação de híbridos de cruzamentos incompatíveis

No melhoramento, cruzamentos interespecíficos e intergenéricos para transferir genes de interesse da espécie selvagem para a cultivada (aumenta a variabilidade genética) podem produzir embriões abortivos devido a incompatibilidade.

Isto ocorre também em cruzamentos onde existam barreiras pré ou pós-zigóticas (sementes murchas e embriões abortivos). Os embriões híbridos são salvos e removidos antes que ocorra o aborto e, posteriormente cultivados in vitro.

c) Superação da dormência das sementes

Em algumas sementes ocorrem inibidores químicos endógenos ou há requerimentos específicos de luz e temperatura ou ainda a resistência física presente nas estruturas que recobrem o embrião. A cultura de embriões é uma alternativa para superar estes problemas.

d) Superação da esterilidade das sementes.

As causas de ocorrência de sementes estéreis em algumas espécies podem ser o desenvolvimento incompleto do embrião, mutações das estruturas que cobrem o embrião ou algum tipo de dormência recalcitrante para a qual nenhum método tem sido desenvolvido.

e) Germinação de sementes de parasitas obrigatórios. Sem o hospedeiro, é impossível a ocorrência in vivo. Assim também a retirada dos embriões e cultivo in vitro pode suprir esta necessidade, permitindo o desenvolvimento de plantas.

f) Prevenção do embrião abortivo que ocorre com o amadurecimento precoce de frutos carnosos

Em cruzamento dos frutos (pêssego, ameixa, cereja) o transporte de água e nutrientes para o embrião imaturo é algumas vezes cortado muito cedo, ocorrendo o aborto.

g) Propagação vegetativa

Devido a sua natureza juvenil com alto potencial regenerativo, embriões são excelentes explantes para propagação clonal in vitro. Especialmente para coníferas e gramíneas.

5.1.4. MICROENXERTIA

Esta técnica (figura 10) consiste em excisar de uma planta matriz uma gema apical ou o meristema propriamente dito que é enxertado sobre uma plântula porta-enxerto que foi obtida em condições assépticas. Sua principal aplicação é a eliminação de viroses e de outros microorganismos de natureza sistêmica que tendem a se acumular em plantas propagadas vegetativamente, quando da impossibilidade de se usar a técnica de cultura de meristemas

Na citricultura esta técnica tem sido empregada rotineiramente nos laboratórios de micropropagação porque no sistema tradicional baseado na propagação de clones nucelares de espécies poliembriônicas, o tempo necessário para a superação da juvenilidade é muito longo. Além disto, em espécies monoembriônicas ocorre variabilidade genética uma vez que o embrião pode ser resultante de um processo de fecundação cruzada.

A termoterapia também pode ser empregada para a limpeza de vírus em plantas de propagação vegetativa, contudo nem todas as plantas apresentam-se isentas dos vírus após serem submetidas a este processo.



Figura 10 – Microenxertia da cultivar de maçã Gala sobre porta enxerto Marubakaido. LFDGV. Fitotecnia. UFSC/CCA, 2002.

5.2. EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

Uma das mais claras demonstrações da totipotencialidade em células de plantas superiores é a obtenção de estruturas embrionárias bipolares em sistemas *in vitro*. De maneira geral este modelo morfogenético inicia com a seleção e ativação de células embriogenéticas competentes (modelo direto) ou com a indução destas células (modelo indireto) e progride através de seqüências idênticas aquelas observadas para a embriogênese zigótica. Na definição de Haccius (1978) embriogênese somática ou adventícia é o processo pelo qual novos indivíduos se originam a partir de células simples, que não são produto da fusão de gametas e que não apresentam conexões vasculares com os tecidos maternos.

A iniciação e o desenvolvimento de embriões somáticos em sistemas *in vitro* foi obtida quase simultaneamente por Steward et al. (1958) e por Reinert (1959) em *Daucus carota*. No final dos anos 70, a ocorrência deste padrão morfogenético já era relatada para 32 famílias, 81 gêneros e 132 espécies vegetais.

Existem claras evidências de que a ocorrência da ES *in vitro* é favorecida por uma adequada manipulação de uma auxina forte no meio de cultura. O 2,4-D parece ser esta auxina na maior parte dos sistemas experimentais. Segundo Vasil (1982), a competência embriogenética é aparentemente adquirida durante o período inicial em cultura na presença de altos níveis desta auxina. Contudo a expressão da embriogênese somática somente ocorre na presença de baixos níveis deste regulador de crescimento.

5.2.1. EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA ADVENTICIA

Ocorre a partir de células ou calos originados em aparatos reprodutivos. As células que iniciam o processo (células-mães) são proembriogeneticamente determinadas (PEDC). Exemplos ilustrativos deste sistema incluem a regeneração a partir do tecido nucelar em citros (Button & Kochba, 1977), de óvulos imaturos de mamão (Litz, 1987) e de videira (Mullins, 1987). Embriões adventícios podem ter origem direta a partir de células simples localizadas na epiderme dos embriões zigóticos, via alteração nos planos de divisão, como é o caso do palmitreiro (Guerra e Handro, 1988), ou indireta a partir de calos de embriões zigóticos de cacau (Pence et al., 1979).

5.2.2. POLIEMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

É uma forma de multiplicação que captura o processo natural de reconstituição do embrião zigótico. Inicia com o transplante para culturas *in vitro* de massas suspensor-embrionárias, que são massas celulares derivadas dos primeiros estágios da embriogênese zigótica. A correta manipulação deste sistema permite a clonagem em larga escala destas células em um ciclo repetitivo. A alteração das condições de cultura permite a progressão destes pró-embriões para estágios subseqüentes (ciclo de maturação) e a obtenção de um grande número de embriões somáticos que podem ser encapsulados em cápsulas de hidrogel para armazenamento ou semeadura (sementes artificiais ou sintéticas). Este processo é distinto daquele verificado para a embriogênese somática adventícia porque os estágios de desenvolvimento ocorrem sem a necessidade de se excisar um tecido, induzir a desdiferenciação e a posterior rediferenciação celular, o que implica dizer que na poliembriogênese somática não há formação de calos.

Além disso, algumas das células transplantadas podem dividir-se sem a necessidade da adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura. Este fenômeno é atribuído a superioridade genética e aos altos níveis endógenos de fitorreguladores nestas células.

A poliembriogênese somática é de ocorrência ampla nas gimnospermas, mas pode ocorrer também em angiospermas. Revisões completas sobre o assunto são encontradas nos artigos de Gupta e Durzan (1986) e Durzan e Gupta (1988) e no livro "Plant Morphogenesis" de Sinnot (1960).

5.2.3. EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA INDUZIDA

Este modelo resulta de calos e suspensões celulares depois que o tecido matriz (explante) é submetido a tratamentos que induzem competência embriogênica (detalhes na figura 12). Isto significa que é necessário que ocorra a desdiferenciação e posterior rediferenciação celular através de uma reprogramação genética (epigênese) cujos determinantes básicos são o estágio fisiológico do explante e o tipo e concentração do regulador de crescimento que atuará como sinal químico para a ativação gênica diferencial. De maneira geral, a perspectiva de sucesso em extrair resposta embriogênica neste modelo depende da utilização de explantes juvenis ou embrionários e da manipulação adequada de uma auxina forte, como o 2,4-D. Esta auxina atua como indutora do processo (efeito "pulse"), contudo sua presença no meio de cultura depois da indução pode causar anormalidades ontogenéticas. Portanto, neste modelo em particular e na embriogênese somática em geral, a ativação ou indução é desencadeada pelo uma auxina forte como o 2,4-D mas a expressão desta rota morfogenética somente ocorrerá em meios de cultura isentos ou com baixas concentrações deste regulador de crescimento.

Exemplos ilustrativos deste modelo foram obtidos e/ou citados para o cafeeiro por Sondahl et al. (1981), para palmeiras por Tisserat et al. (1979), para gramíneas por Vasil (1982), para soja por Christianson (1985) e para cenoura por Litz et al. (1985), cujos artigos ampliam e aprofundam detalhes sobre este modelo.

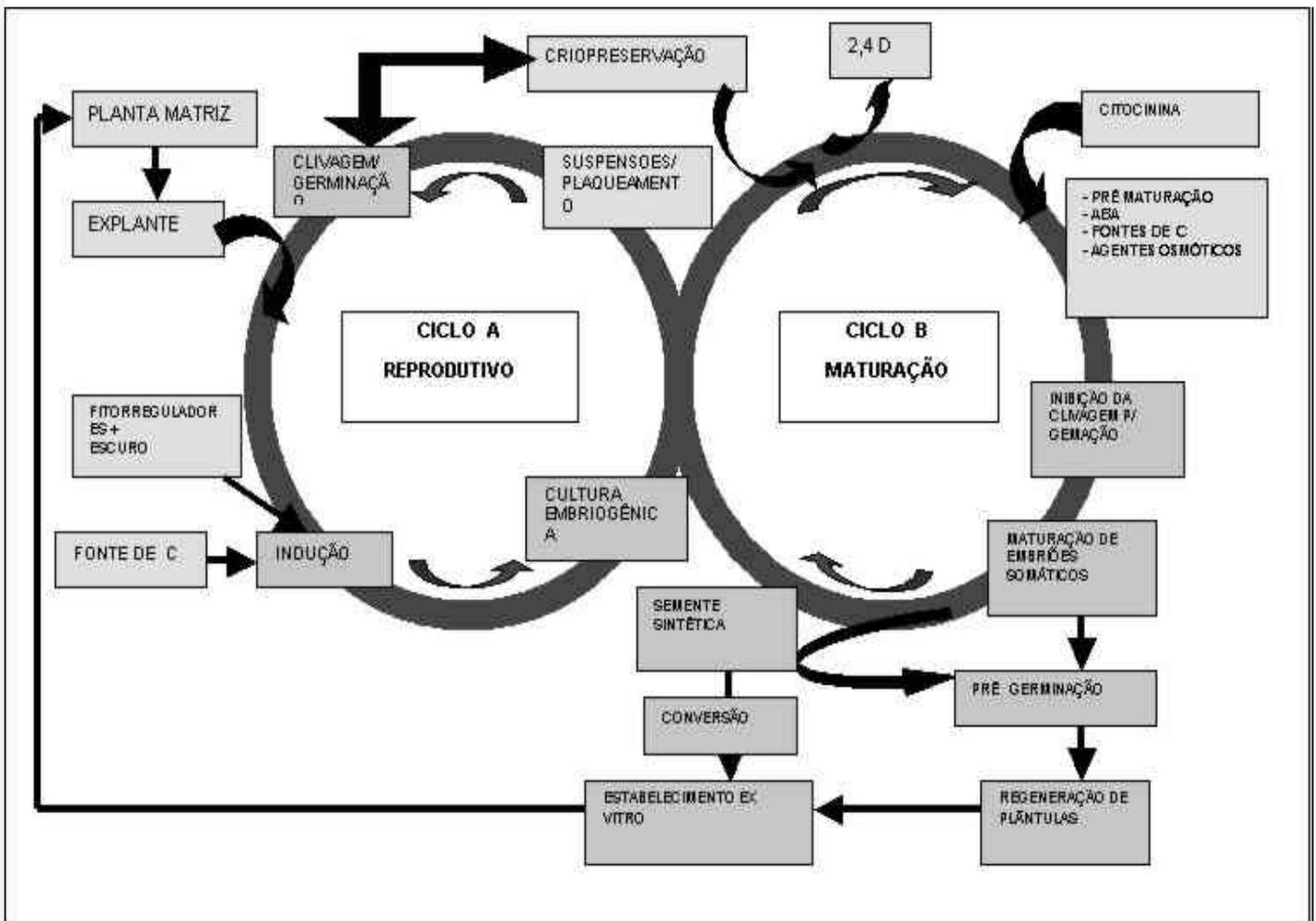


Figura 12 - Ciclos da embriogênese somática e a sequência de eventos celulares da desdiferenciação e diferenciação (Adaptado de Durzan, 1988)

5.2.4. SUSPENSÕES CELULARES

Suspensões celulares consistem de células e agregados celulares dispersos em meios líquidos em agitação. O crescimento celular baseia-se nas mudanças das taxas de divisão em fases definidas. No início as células dividem-se lentamente (lag fase), posteriormente ocorrem fases de rápido crescimento (exponencial e linear) e por fim, as células tendem a taxas menores de divisão por efeito de competição (fase estacionária). Neste momento, através da subcultura de uma amostra destas células, é possível reiniciar a cultura e este procedimento pode ser mantido indefinidamente (Street, 1977).

Suspensões celulares podem ser iniciadas pela inoculação de calos friáveis ou outros tecidos que possam originar linhagens celulares organogênicas ou embriogênicas. Uma suspensão celular de primeira passagem contém uma mistura de células vivas, mortas e resíduos. Filtragem seletiva, uso de pipetas ou seringas auxiliam na obtenção de culturas puras e homogêneas.

A possibilidade da manipulação e do cultivo de células em escala comercial pode exigir o uso de biorreatores. Estes equipamentos foram desenvolvidos originalmente para o cultivo de microorganismos e outras células vivas para propósitos de fermentação e/ou para a produção de produtos secundários para uso industrial. Para suspensões celulares vegetais, os meios de cultura são praticamente idênticos aqueles exigidos para a obtenção de calos e incluem os macro e micronutrientes, sacarose, vitaminas e um adequado balanço de reguladores de crescimento.

De maneira geral a maior utilidade dos biorreatores relaciona-se com a obtenção de um grande número de células ("scale-up") em ciclos repetitivos de divisão celular e para a obtenção de metabólitos secundários. Para efeitos de micropropagação, as células obtidas são plaqueadas e manipuladas para a ativação de processos regenerativos nas rotas de organogênese ou embriogênese somática. A indução/ativação de linhagens celulares embriogênicas através de suspensões em meios líquidos pode propiciar a obtenção de uma relação direta (1 célula pró-embriônica/ 1 plântula) e parece ser o melhor sistema pelo qual tecnologias de encapsulamento em hidrogel possam gerar sementes sintéticas. Além disto, o estabelecimento de linhagens celulares embriogênicas é a maneira mais elegante de se manipular e modular a embriogênese somática para a propagação massal de genótipos superiores. Suspensões celulares são também as melhores fontes para a obtenção de protoplastos para propósitos de fusão, transformação e introdução de organelas.

5.2.4.1. Aplicações da suspensão celular:

É usada para obtenção de sementes sintéticas (embriogênese somática isolamento de protoplastos, isolamento de mutantes, obtenção de resistentes certos elementos (Alumínio, toxinas, herbicidas, sal), produção de metabólito secundários e nos processos de transformação de plantas.

5.2.4.2. Métodos mais utilizados para medir o crescimento celular:

Para quantificar o crescimento de células em suspensão, são utilizados principalmente os métodos baseados no número de células, peso de matéria seca peso de matéria fresca, volume de células e proteína total da célula.

Um calos típico iniciado de um explante passa por três estágios de desenvolvimento, que compreende a indução da divisão celular, um período de divisão celular ativa durante o qual as células diferenciadas perdem a; características especializadas para tornarem-se desdiferenciada e um período no qual a divisão celular é reduzida ou mesmo cessa, iniciando então a especialização celular. Esses estágios podem ser acompanhados numa curva de crescimento caracterizadas por seis fases (figura 13).

- **Fase lag:** é caracterizada por não ter ganho em número de células, pelo início da mobilização de metabólitos sem ocorrer qualquer divisão celular, pela síntese de proteínas e síntese de metabólitos específicos. A atenção deve ser dada à densidade do inoculo que afeta o comprimento da fase lag. Quanto menor o peso do calos utilizado, maior é a fase lag.
- **Fase exponencial:** é caracterizada por divisão celular intensa, aumento no número de células, porém células de tamanho pequeno com formação de agregados de células.
- **Fase linear,** a fase exponencial é seguida pela fase linear. O crescimento celular é ativo e as células adquirem competência para proceder a repicagem.
- **Fase de desaceleração:** ocorre uma redução na divisão celular. É no final dessa fase que se deve iniciar o processo de repicagem.
- **Fase estacionária:** a repicagem deve ser terminada ainda no início dessa fase quando não há divisão celular. As culturas não podem ser mantidas nessa fase por um período longo.
- **Fase de declínio:** as células começam a morrer, culminando com a lise celular.

5.2.4.3. Importância da dinâmica de crescimento

A curva de crescimento de calos é calculada com o objetivo de se obter a época de repicagem (subcultura), para determinar onde há a maior produção de metabólitos (quando o estudo objetiva o metabolismo secundário). Esta fase é de desaceleração, pois os metabólitos secundários não constituem prioridade no metabolismo celular.

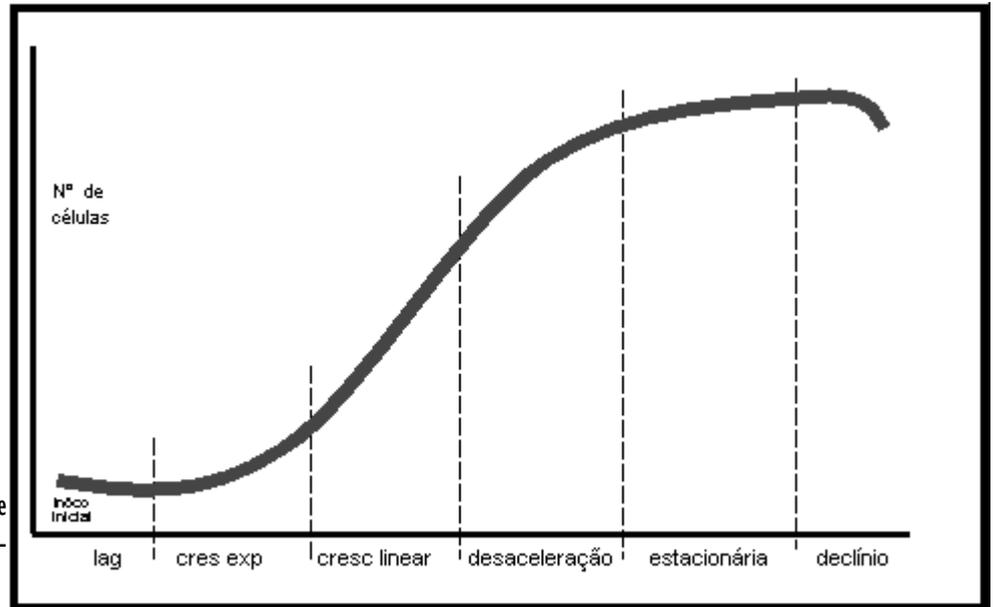


Figura 13 - Dinâmica de crescimento de uma suspensão celular. (Adaptado de George, 1993).

5.2.5 .BIORREADORES

Os biorreatores são equipamentos usados para micropropagação clonal e massal de plantas, cujo objetivo é a imersão temporária ou permanente de cultura de células ou tecidos vegetais ao meio de cultivo líquido. Tem propósito fundamental de facilitar o trabalho rotineiro e melhorar as condições ambientais e asépticas para as culturas, produzindo em larga escala..

Historicamente, os biorreatores foram mais conhecidos por fermentadores e estavam direcionados para o cultivo de células ou microrganismos, com vistas a produzir metabólitos secundários, alcalóides, antibióticos, entre outros (Barruetto, 2002). O nome fermentador está relacionado etimologicamente com fermentação que, na sua raiz latina, deriva de fermentare, cujo significado é ferver, isto é, produzir bolhas de ar, numa alusão ao fato de os fermentadores serem destinados a processos fermentativos como, por exemplo, a produção de álcool, onde as leveduras regeneram NAD a partir de sua forma reduzida NADH, com produção de etanol e CO₂, na qual este último, pela aparição de bolhas, dá a idéia de fazer ferver o meio líquido nutritivo (Leveau & Bouix, 1985).

Inicialmente, e pelo fato de serem destinados a usos industriais, esses fermentadores foram de grande capacidade: de 20 a 4.000 mil litros de meio líquido nutritivo. Em decorrência disso, esses fermentadores devem ter acurados sistemas de oxigenação, agitação mecânica do meio líquido, monitoramento do pH, da temperatura e da formação de espuma, tudo o que os converte em verdadeiras obras da engenharia e da automatização, que asseguram à parte biótica (microrganismos) sobreviverem nesse ambiente abiótico artificial, visando aumentar seus rendimentos (biomassa, metabólitos secundários, antibióticos, etc.), porém com altos custos de instalação.

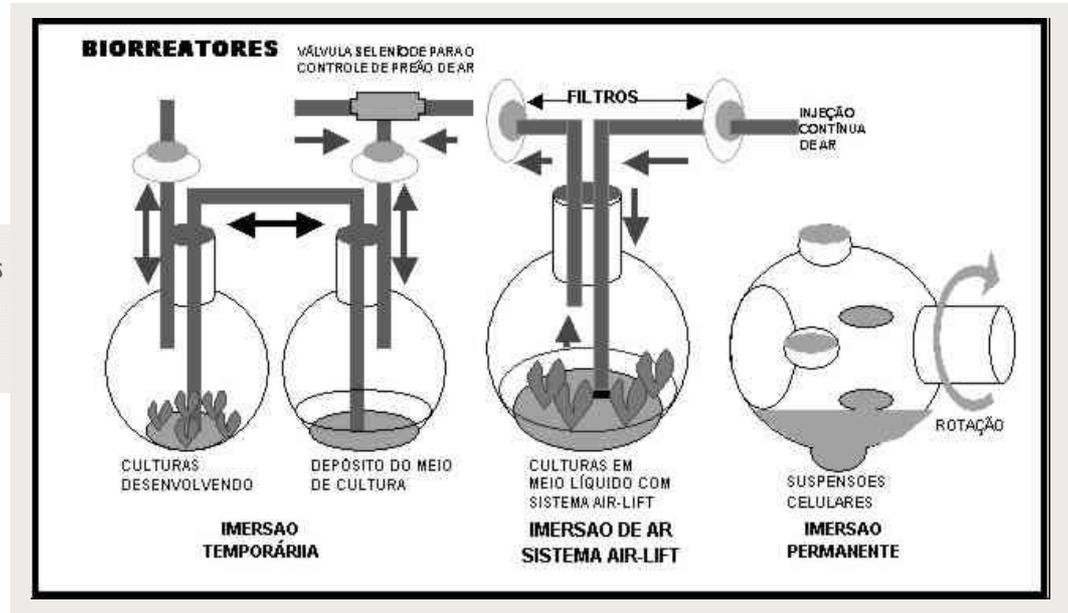
Paralelamente à biotecnologia da fermentação, a cultura de tecidos vegetais vinha desenvolvendo seu trabalho biotecnológico de manipulação de células, tecido e órgãos com vistas a propagar material clonal para uso comercial.

Os primeiros biorreatores adaptados para plantas datam de, aproximadamente, 26 anos atrás (Levin et al., 1988) De lá para cá, muitos tipos têm sido propostos, isso porque um biorreator é concebido em função do tipo de processo que se deseja obter. Assim, para embriogênese somática, se requer um tipo de biorreator, mas, para micropropagar através de organogênese, gemas, o desenho mais eficiente pode ser outro (Merchuk, 1990).

5.2.5.1. Sistemas de biorreatores

Biorreatores de imersão temporária; Consiste geralmente de um conjunto de dois recipientes com capacidade de 1 a 5 litros. Um que contém o meio de cultivo líquido (menos de 20% da capacidade do frasco), outro que comporta os explantes. Em tempo pré-determinado ocorre a transferência do meio de cultivo para o frasco que contém os explantes por um breve período (de 1 a 3 minutos). Depois o meio é sugado para o depósito em mesmo nível ou escoado em depósito com nível inferior. Este ciclo é repetido a cada hora, ou então, conforme as exigências do explante. Sua utilização efetiva tem sido para sistemas morfo-gênicos, já que uma das dificuldades é a fixação de pequenos explantes (figura 14).

Figura 14 – Tipos de biorreatores e sistemas de funcionamento



Biorreatores de imersão permanente; Em geral são os biorreatores utilizados para a micropropagação massal de plantas, mais especificamente para a cultura de células isoladas, calos ou de protoplastos. Tem pequena capacidade (1 a 5 litros), e, no caso de serem desenhados para multiplicação de células ou embriões somáticos.

Devem possuir um sistema de oxigenação, um outro de agitação mecânica, por meio de pás giratórias ou um sistema vibratório para produzir a turbulência necessária à homogeneização e homeostase no interior do biorreator, e ainda, sensores de pH, temperatura, O₂ e espuma (Preil et al. 1988; Takayama & Akita, 1994). Também outra opção são balões volumétricos com depressões laterais, os quais são rotacionados em sentido orbital (figura 14).

Biorreatores de tipo air-lift; No tocante à propagação de plantas através de gemas, existem os biorreatores de imersão temporária (Alvard et al., 1993) e os de borbulhamento contínuo ou imersão permanente (BIPER) tipo air-lift (George, 1993-96). Nos de imersão temporária, as gemas a serem multiplicadas ficam expostas a ciclos de imersão, evitando a presença de dispositivos de agitação e arejamento e, portanto, simplificando o desenho do biorreator. Este biorreator, basicamente é um sistema de engenharia simples e barata. Consta de um recipiente de vidro com capacidade de 500 a 1000 ml, cuja tampa apresenta dois furos, um para a entrada do ar e outro para saída, sendo que, em ambos os casos, esses orifícios estão providos de dutos de aço inox com filtro Millipore (0,2 µm de poro) a fim de evitar a contaminação interna.

O ar é provido através de um microcompressor (aproximadamente 3 litros/ minuto), e conduzido ao fundo do recipiente através de uma mangueira de silicone, de onde sai, através de um tubo poroso, formando bolhas que agitarão o meio líquido. Com exceção da borracha que liga o filtro de entrada ao compressor, todos os componentes do sistema são autoclaváveis (120°C e 20 minutos) (figura 14).



Figura 15 - Culturas de bromélia cultivada em processos de biorreatores de imersão temporária e a seqüência de formação, determinação e regeneração dos explentes. LFDGV, Fitotecnia, UFSC/CCA, 2001.

5.2.5.2. Inoculação dos explantes

É feita a autoclavagem, o frasco, contendo o meio nutritivo. Depois em câmara de fluxo laminar é aberto para a inoculação de brotos, suspensões celulares ou calos. O meio líquido normalmente é constituído do meio SP (Barrueto Cid et al., 1999) complementado com diferentes concentrações de BAP (6-benzilamino purina) segundo se trate de orquídeas (*Ionopsis ochlereuca*), abacaxi (*Ananas comosus* L. cv. Perola) café (*Coffea arabica*), mamão (*Carica papaya* L. cv. Tainug), álamo (*Populus tremula* x *P. alba*). As touceiras contendo um número variado de brotos são previamente obtidas em meio sólido e é uma pré-condição ter seu protocolo de multiplicação estabelecido, antes de iniciar os trabalhos com o biorreator. Os explantes em geral podem ser de origem do próprio sistema dos biorreatores, dando a possibilidade de processar cultivos seqüências de explantes em escalas comerciais, as biofábricas.

5.2.6. PROTOPLASTOS

Protoplastos são a parte viva das células vegetais. Contém o núcleo, citoplasma, vacúolo e outros componentes celulares circundados por uma membrana semi-permeável. A célula vegetal, em contraste com a célula animal, é circundada por uma parede celular constituída de celulose, hemicelulose e materiais péclicos. Protoplastos podem ser obtidos a partir de células em suspensão ou diretamente a partir de células do mesófilo foliar.

A obtenção de protoplastos foi possível a partir da descoberta de que a parede celular das células vegetais poderia ser removida por enzimas que a digerem (Cocking, 1960). Preparações enzimáticas comerciais são baseadas em misturas de celulase e pectinase. A manutenção de uma pressão osmótica adequada é necessária para prevenir a ruptura da membrana celular e para contrabalançar a remoção da parede celular. A utilização de alguns corantes tais como carmin acético, azul de Evans e compostos de reação de fluorescência pode indicar a viabilidade ou não dos protoplastos obtidos.

As aplicações das técnicas de isolamento e regeneração de protoplastos podem ser vistas sob dois ângulos. Do ponto de vista do conhecimento básico é possível o estudo dos aspectos relacionados com a formação da parede celular e com a ontogênese de processos regenerativos a partir de células simples. Do ponto de vista aplicado torna-se possível a utilização de técnicas de transformação como a fusão de protoplastos de espécies não aparentadas, rompendo com isto os limites impostos pela propagação sexual. A fusão de protoplastos de genótipos distintos gerando a combinação de dois núcleos e citoplasmas é chamado de hibridização somática ou parasexual. Além disto, protoplastos são considerados como o material ideal para a utilização de técnicas de transformação direta através de metodologias envolvendo DNA recombinante.

5.2.7. CULTURA DE POLÉN E ANTERAS

A cultura de anteras é uma técnica para a obtenção de plantas haplóides a partir de plantas normalmente diplóides. A descoberta que o grão de pólen poderia desenvolver embriões foi feita por acaso na década de 60. Atualmente, muitas plantas são produzidas a partir do grão de pólen imaturo ou calo que desenvolve a partir do micrósporo.

A cultura de anteras tem grande potencial para o melhoramento de plantas e é usada para a obtenção de plantas haplóides. A palavra haplóide refere-se a plantas que possuem o número gametofítico de cromossomos em seus esporófitos, ou seja, são originárias de um esporófito e contém metade do número de cromossomos da espécie.

Plantas haplóides podem ser obtidas in vivo através de polinização com pólen irradiado, polinização com pólen abortivo (estéril), tratamento do pólen com choques térmicos, hibridação distante. In vitro pode ser obtido pelo desenvolvimento da oosfera não fertilizada, pela cultura de anteras e ou grãos de pólen (diretamente por embriogênese e indiretamente via formação de calos).

As fontes de explantes usadas são anteras imaturas, que fornecem pólen uninucleado (por ocasião da primeira mitose) se constituindo no material mais promissor para indução de androgênese e botões florais fechados.

5.2.7.1. Obtenção de haplóides por cultura de anteras

O protocolo para cultura de anteras pode ser descrito resumidamente:

- a) os botões florais fechados são desinfestados;
- b) faz-se uma incisão de um dos lados do botão floral e estames são delicadamente removidos. O filamento do estame é removido (com bastante cuidado para não danificar as anteras) e
- c) as anteras são inoculadas em meio de cultura.

5.2.7.2. Fatores que influenciam a androgênese

1) Genótipo da planta doadora: tem sido observado que gêneros, espécies e cultivares apresentam diferentes respostas na cultura de anteras.

2) Condições fisiológicas e idade da planta: flores das plantas relativamente novas, no início da floração são mais adequadas do que botões florais de plantas velhas e em final de seu período de crescimento.

3) Estádio de desenvolvimento do pólen: o micrósporo no estágio uninucleado é o mais adequado (antes ou logo após a primeira antese). Existe correlação entre o tamanho do botão floral e o estágio do desenvolvimento do pólen (importante ao se considerar a ploidia do embrião produzido). O estágio do desenvolvimento do pólen na antera pode ser determinado pelo corante acetocarmicima ou reagente de Schiff.

4) Pré-tratamento dos botões ou anteras:

a) Tratamento térmico: deve ser feito em baixa temperatura (3 a 5° C). Assim se retém a viabilidade do pólen por mais tempo, retardando a senescência, sincronizando as células e prevendo o aborto do pólen.

b) Tratamento químico: aplicações de químicos como o etrel (paclobutrazol), hidrazida maleica, carvão ativado, podem induzir as anteras a formar em embriões.

c) Tratamento físico: radiações ionizantes, pressões atmosféricas reduzidas (uso de dissecador); centrifugação.

5) Composição do meio de cultura: os meios mais utilizados são o MS, White, Nitsch. A sacarose é a fonte de carbono mais efetiva de carboidratos e sua concentração varia com as espécies.

A necessidade de reguladores de crescimento, também é variável. Suplementos orgânicos como caseína hidrolizada, água de coco, extraído de leveduras, aminoácidos, ácido ascórbico tem sido utilizados com sucesso.

5.2.7.3. Identificação de haplóides

A identificação de haplóides pode ser feita com genes marcadores, que produzem cor, cuja manifestação possa ser mostrada na semente ou plântulas. Marcadores morfológicos e por contagem de cromossomos, através de técnicas citológicas.

5.2.7.4. Problemas

Alguns problemas relacionados à cultura de anteras podem ocorrer quando são usadas técnicas inadequadas para se produzir plantas dipóides a partir de haplóides regenerados de cultura de anteras; uso de técnicas inadequadas de regeneração; ocorrência de elevada taxa de mutação (anormalidades); desdiferenciação de calo a partir de células dos tecidos somáticos da antera e; alta incidência de plantas albinas (principalmente em gramíneas)

5.2.7.5. Utilização de plantas haplóides

A técnica da androgênese permite:

a) Obtenção de homozigose. Em programas de melhoramento, onde é necessário a obtenção de linhagens, a homozigose destas pelos processos tradicionais só ocorre após 6 a 8 gerações de autofecundação ou retrocruzamento. Através da cultura de anteras, plantas haplóides são obtidas imediatamente, pois uma vez duplicado seu número de cromossomo, originam plantas diplóides que apresentam homozigose em 100% dos loci, reduzindo o tempo.

b) Produção de supermachos. Tomando-se com exemplo o aspargo, que é dióica, as plantas masculinas são mais produtivas. Há interesse na determinação de um método que produza por sementes todas as plantas híbridas F, heteróticas masculinas. A partir de plantas femininas (XX - homogaméticas) e plantas masculinas (XY -heterogaméticas), por cultura de anteras, pode-se obter plantas haplóides tanto X como Y, pela duplicação: XX (plantas femininas) e YY (supermachos). Usando estes supermachos na produção de híbridos, toda a progênie de plantas será masculina (XY) e portanto, mais produtiva e menos fibrosa.

A obtenção de haplóides *in vitro* pela cultura de anteras já é uma realidade em solanáceas, gramíneas e crucíferas.

5.3. CRIOPRESERVAÇÃO

Desde o início da multiplicação clonal ou da micropropagação das plantas, uma das grandes dificuldades era a conservação de estoques de material vivo para os cultivos posteriores. A conservação por um longo período pode ser aplicada por técnicas de congelamento de explantes a baixas em nitrogênio líquido (-196° C). a partir de então tornou-se possível não só a conservação do material por um período mais longo, como também a conservação de recursos genéticos vegetais de germoplasmas. Este procurou atender dois problemas básicos de estocagem em bancos de germoplasma; de materiais de propagação vegetativa e de espécies com sementes recalcitrantes.

5.3.1. Métodos para a criopreservação

Basicamente são dois os métodos; o congelamento gradual e o congelamento imediato.

O resfriamento lento é composto de etapas de congelamento a -20° C em freezer, seguido de abaixamento de -70 a -100°C e a criopreservação em -196° C.

No congelamento rápido existe a necessidade de evitar que as células produzam cristais a partir do conteúdo celular. Através dessa técnica o conteúdo celular aquoso adquire a conformação vítrea, o que é desejável.

Dois momentos são críticos para a cultura a ser criopreservada quanto a possibilidade da formação de cristais; na entrada e na saída da criopreservação. É a razão do sucesso e do fracasso desta técnica em muitos experimentos.

Antes da cultura entrar para o sistema de criopreservação, é aplicado um redutor osmótico (manitol 4%) para diminuir o conteúdo celular e um crioprotetor (DMSO), cuja função é de modificar a permeabilidade da membrana, proteção de macromoléculas e inativação de radicais livres (Benson & Withers, 1987).

A criopreservação pode atender a conservação de suspensões celulares utilizando os seguintes passos (Torres, 1998):

- Pré-condicionamento por 5 dias em meio contendo 6% de manitol.
- Crioproteção com 0,5 mol.l⁻¹ DMSO + 0,5 mol.l⁻¹ de glicerol + 1,0 mol.l⁻¹ de sacarose no meio de cultura.
- Transferir as células e solução crioprotetora para uma ampola e congelar a uma taxa de 1° C por minuto até -35° a -40°C, manter a temperatura por 40 minutos, após transferir para o nitrogênio líquido.
- Armazenar em nitrogênio líquido;
- Descongelar em banho-maria a 40° C.
- Extrair as culturas dos meios de crioproteção.

Para culturas de parte aérea o procedimento é assim definido (Torres, 1998):

- Pré-condicionamento por 2 dias em meio contendo 5% de DMSO.
- Crioproteção com 10% de DMSO no meio de cultura.
- Transferir as células e solução crioprotetora para uma ampola e congelar a uma taxa de 0,5° C por minuto até -40°C, manter a temperatura por 40 minutos, após transferir para o nitrogênio líquido.
- Armazenar em nitrogênio líquido;
- Descongelar em banho-maria a 40° C.
- Extrair as culturas dos meios de crioproteção.

6. PROBLEMAS NA CULTURA *IN VITRO*

O cultivo *in vitro* como qualquer outro processo é sensível a alguns problemas de ordem ambiental ou biológico que afetam diretamente o desenvolvimento das culturas. Dentre estes problemas pode-se citar a oxidação, o declínio no vigor e a hiperhidricidade.

6.1. DECLÍNIO DE VIGOR

As plantas desenvolvem o metabolismo de acordo com os estímulos recebidos, e portanto, quando ocorre problemas determinantes é refletido diretamente na fisiologia vegetal do explante. A baixa taxa de desenvolvimento é chamada de declínio do vigor e está associado com a produção de substâncias fenólicas ou a outros fatores como vitescência, habituação ou maturidade dos explantes.

A perda de vigor pode ser também afetado por erros no balanço nutricional do meio de cultura, utilização de fitorreguladores inadequados ou falta de repicagem do material vegetal.

a) Diminuição da taxa de proliferação

algumas espécies apresentam curvas acentuadas na taxa de proliferação da cultura. Esta taxa é bastante variável de acordo com espécie e o tempo de cultivo ou subcultivos.

O declínio na taxa de formação de brotos também ocorre frequentemente em culturas que não são repicadas.

b) Habituação

Quando os explantes estão em meio de cultura, pode haver habituação para fitorreguladores como a citocinina, que por doses de concentração normais não respondem bem ao estímulo.

6.2. NECROSES

Necrose pode ser descrita como sendo a morte de uma parte de um organismo vivo. Isto ocorre com explantes colocados *in vitro*, podendo ter uma perda parcial ou a de toda a cultura (Santos, et. al., 2001).

a) Necrose apical em brotações

Causas:

- Deficiência de cálcio – ocorre principalmente no ápice quando o explante é colocado em meios com baixa concentração para a espécie ou quando ocorrem barreiras de disponibilidade do nutriente para a planta. Muito comum acontecer problemas relacionados com elevadas temperaturas que favorece a diferença entre crescimento e translocação do nutriente. Em cultivo *in vitro*, a alta umidade limita a transpiração e consequentemente a translocação no xilema de íons e compostos, assim como o cálcio pode não alcançar os tecidos da região apical.

- Substâncias de crescimento - Alguns fitorreguladores podem induzir a necrose apical, principalmente em subculturas, ou ainda, meio inadequado para determinada fase.

- Intervalo de subculturas – quando as subculturas não são repicadas e ficam velhas pode ser observado folhas amarelas e queda destas. O momento de fazer a subcultura deve se ajustado de acordo com cada espécie de cultivo.

- Gases tóxicos – a chama do bico de bussen para a flambagem da boca dos frascos pode produzir internamente e a diminuição de oxigênio. Ocorre a produção de gases como o metano, butano, entano, propano, etileno, metanol e etanol. Esses gases provocam a abscisão foliar, podendo causar a paralisação da cultura, ou ainda ocasionar a morte das brotações. O próprio estado de desenvolvimento fisiológico e crescimento da planta pode produzir altas taxas de CO₂, que também é variável de acordo com o período do dia.

b) Diminuindo a necrose

Prover as culturas com nitrato de cálcio e procurar disponibilizá-lo na forma de fornecer ambiente adequado favorece a diminuição de necroses. Outro nutriente importante para algumas espécies é o boro, que também atua nas regiões de intensa divisão celular.

A redução dos gases pode ser conseguida com chamas de cor azul para fazer a flambagem da boca dos frascos. Também as fontes podem ser substituídas como areia seca em altas temperaturas.

Permitir as trocas gasosas em culturas que se deseja crescimento reduz a concentração de gases tóxicos e aumenta a disponibilidade de oxigênio. Porém, esta prática não deve ser adotada quando se deseja um crescimento mais lento da cultura.

6.3. OXIDAÇÃO

A oxidação é a reação do oxigênio com íons metálicos (+) dos outros compostos do meio de cultivo. Os explantes ao serem inoculados no meio de cultura podem liberar exudatos que tornam o meio de cultivo escuro. Este tipo de escurecimento é consequência da liberação de fenóis dos ferimentos ocasionados no processo de extração dos explantes (Santos, 2001).

As substâncias encontradas em meio de cultura no cultivo de algumas espécies lenhosas foram identificadas como sendo taninos, flavonóides e fenóis (George, 1993). Ferimentos normalmente provocam oxidação, sendo que discos foliares apresentam maior oxidação do que segmentos nodais por sofrerem ferimentos em maior área. O efeito inibitório no desenvolvimento dos explantes é atribuído à presença de taninos e fenóis, sendo a autotoxicidade dos exudatos variável com as cultivares, espécies e gêneros.

A ocorrência de oxidação pode ser geneticamente correlacionada, ou seja, em gêneros cujas plantas apresentam maiores teores de tanino ou hidroxifenóis a oxidação ocorre de forma mais intensa como é o exemplo de Quercus, Rhododendron, Sorghum e das coníferas (Santos 2001).

Compostos como a cisteína, o carvão ativado, PVP, ácido ascórbico e ácido cítrico têm sido adicionados ao meio de cultura com o objetivo de controlar o processo de oxidação.

Carvão ativado adicionado ao meio de cultura em concentrações que variam de 0,3 a 2,0%, cuja ação é adsorver fenóis do meio de cultura, além de atuar induzindo os processos de morfogênese e rizogênese.

A poliamina PVP possui também a capacidade de adsorver os compostos fenólicos evitando que estes oxidem e polimerizem. Esta substância é geralmente adicionada ao meio de cultura em concentrações que variam de 0,01- 4,0 %.

Composição dos meios de cultura com variações na concentração do meio MS, sacarose, exclusão ou diminuição em concentração de ferro e cobre, uso de reguladores de crescimento (variações em tipo e concentrações) além da adição de antioxidantes também podem ser eficientes para controle da oxidação. O ácido cítrico atua como agente quelante de metais, mas não é muito eficiente em retirar ferro da solução. Já o ácido ascórbico normalmente é acrescido ao meio de cultura, possuindo a propriedade de estimular a atividade metabólica dos tecidos. A efetividade destes ácidos só tem sido observada, quando adicionados ao meio em concentrações entre 10 e 140 mgL⁻¹, podendo reduzir a oxidação em 50%.

Explantos jovens são mais propensos a ocorrer a oxidação e geralmente no início da cultura de tecidos. A prevenção da ocorrência de oxidação pode ser feita minimizando os danos causados ao explante, removendo os compostos fenólicos produzidos ou através da alteração da composição do meio de cultura e a concentração ou tipo de reguladores de crescimento empregados. A remoção dos compostos pode ser feita ainda pela utilização de meios líquidos (facilitam a difusão dos compostos), de diferentes agentes de solidificação, além da adição ao meio de substâncias de adsorção.

O agar usado para geleificação do meio pode conter compostos como açúcares, galactose, sulfatos reativos e até mesmo presença de cobre, podem apresentar elevada oxidação.

6.4. HIPERHIDRICIDADE

A hiperhidricidade é definida como o estado fisiológico que a planta apresenta elevado teor de água no interior das células e tecidos com aspecto translúcido. As alterações na estrutura das plantas cultivadas in vitro são sintomas bastante prematuros de uma complexa síndrome de características anormais.

O fenômeno pode ser revertido, desde que seja realizada a transferência de meio de cultivo e adequar o ambiente, dando atenção especial para a temperatura, irradiância, fotoperíodo e concentrações dos elementos do meio de cultivo.

A "síndrome do broto de vidro" como também é chamado pode ocorrer em vários níveis de severidade. Inicialmente, apenas uma parte do broto, ou uma ou duas folhas podem ser afetadas. As brotações de culturas que demonstram sintomas leves frequentemente crescem mais rapidamente do que o normal e pode mostrar altas taxas de brotações axilares. Esta vantagem é perdida em condições mais severas de hiperhidricidade (Santos, 2001).

Em casos mais extremos, brotos vitrificados tem internódios curtos e o ápice aparece fasciculado. Os brotos afetados frequentemente apresentam-se inchados e com uma coloração verde claro e suas folhas são translúcidas, aquosa e com aparência de vidro; as folhas se apresentam também alongadas, túrgidas e frágeis, com uma coloração verde azulada.

a) Ocorrência

A hiperhidricidade pode ocorrer em culturas de brotos e nós, em regeneração de brotos a partir de calos, em todas as espécies. É mais freqüente em massa de calos de plantas lenhosas, mas também ocorre em plantas herbáceas, pode ser consequência da difusão passiva da água dentro dos tecidos ou um fenômeno ativo relacionado a um distúrbio no processo metabólico da planta.

b) Fatores que influenciam a hiperhidricidade

Culturas que desenvolvem-se rapidamente são menos propensas. Quando se busca melhores condições de cultivo para cada espécie, diminui-se expressivamente o risco de ocorrer a hiperhidricidade.

A hiperhidricidade tende a ser promovida por altas temperaturas, baixa irradiância luminosa ou em culturas mantidas no escuro.

Broto que se desenvolvem em condições contínuas de alta umidade relativa apresentam maior susceptibilidade à hiperhidricidade, pois este é provavelmente o ambiente mais favorável para ocasioná-la. Culturas mantidas em meio líquido, incluindo aquelas realizadas com suportes (ponte de papel) geralmente desenvolvem mais facilmente do que aquelas que são cultivadas em meio sólido.

Em algumas plantas, brotações normais cultivadas em meio sólido ficam totalmente vitrificadas quando são transferidas para um meio de cultivo líquido.

Os brotos apresentam sintomas mais freqüentes quando se utiliza concentrações de BAP acima de 2,0 mg.L⁻¹, suplementado com sacarose e baixas concentrações de sorbitol. Culturas em meios com altas concentrações de BAP sofrem imensamente a indução de hiperhidricidade. Isto pode ser evitado transferindo a cultura para um meio que não possua BAP. As auxinas podem às vezes induzir a hiperhidricidade entretanto, a adição de auxinas no meio contendo citocininas, frequentemente aumenta a proporção de vitrificação. O ácido giberélico pode ser utilizado no controle deste problema.

c) Diminuindo a hiperhidricidade

Existem vários fatores que podem auxiliar na prevenção da vitrificação, dentre estes pode-se destacar:

- 1) Utilização da técnica de duas fases (meio líquido e sólido) no meio de cultura.
- 2) Aumento da concentração de ágar no meio semi-sólido.
- 3) Controle da concentração de sacarose.
- 4) Redução da umidade relativa no ambiente *in vitro*.
- 5) Em meio líquido, utilizar suportes porosos para sustentação dos explantes (ponte de papel).
- 6) Adição ao meio de cultivo um ou mais ácidos orgânicos como o citrato, succinato ou malato para auxiliar a assimilação do NH_4^+ .
- 7) Redução da concentração de íons de amônio no meio de cultivo.
- 8) Utilização de alta luminosidade.
- 9) Em meio líquido pode adotar a técnica de submersão temporária.
- 10) Utilização de um balanço mais adequado entre auxina / citocinina para a espécie estudada.
- 11) Redução da concentração de micronutriente no meio de cultivo.
- 12) Transferência da cultura para um meio de cultivo ausente de fitorreguladores.
- 13) Diminuição do uso de citocininas ou restrição do uso do BAP. Pode-se também aumentar o número de subcultivos.
- 14) Substituição da sacarose por frutose ou galactose.
- 15) Ajuste correio do pH do meio de cultivo.

7. ACLIMATIZAÇÃO DAS PLANTAS

Aclimatização e aclimatação são termos que apresentam conotações diferentes. O primeiro trata dos processos para a passagem da planta que está *in vitro* para o ambiente e é definido como a adaptação climática de um organismo, especialmente uma planta, que é transferida para um novo ambiente, sendo todo esse processo realizado artificialmente. O termo aclimatação tem um significado similar, mas é um processo no qual as plantas ou outros organismos se tomam ajustados a um novo clima ou situação, como resultado de um processo essencialmente natural. Na figura 8 são apresentadas as etapas do desenvolvimento vegetal observando as fases da aclimatização e enraizamento de *Feijoa sellowiana*.

Pesquisas foram realizadas para verificar quais os possíveis problemas referem-se à aclimatização. Um grande número de planta micropropagada não sobrevive quando são transferidas das condições *in vitro* para o ambiente externo.

7.1. PROBLEMAS DA ACLIMATIZAÇÃO

a) Baixa capacidade fotossintética

A estrutura e a morfologia interna das plantas micropropagadas são, inicialmente, muito diferentes daquelas cultivadas em condições de campo. Esta variação na anatomia ou ultra-estrutura pode afetar o processo de fotossíntese. As organelas que apresentam capacidade autotróficas não estão bem desenvolvidas, e conseqüentemente, existe uma dificuldade em aclimatização.

No estágio de aclimatização as plântulas sofrem uma mudança drástica quando são removidas dos frascos onde a luz e as trocas gasosas são limitadas e existe grande disponibilidade de açúcar. Essa passagem faz com que mudem de heterotróficas para autotróficas, com grande gasto de energia.

b) Desidratação

A desidratação é causada pela elevada perda de água pelas plantas, principalmente nas folhas, ou absorção inadequada de água pelas raízes e, em geral, é o maior problema no processo de transplante e aclimatização. *In vitro*, as plântulas se desenvolvem com baixa luminosidade e elevada umidade relativa com conseqüente redução do fluxo respiratório. Ao serem expostas a um ambiente com alta luminosidade e baixa umidade relativa, a taxa de transpiração aumenta, surgindo um déficit hídrico na planta.

As plantas que são levadas às casas de vegetação são desprovidas de cutícula na folha e possuem muitos estômatos não funcionais. Quando expostas ao ambiente ocorre elevada perda de água e um agravamento osmótico intracelular.

A morfologia e a densidade dos estômatos podem ser alteradas mudando-se as condições ambientes. Em plântulas de rosa, por exemplo, um aumento na luminosidade e uma diminuição na umidade relativa de 100 para 75%, resultou em estômatos semelhantes às plantas cultivadas em estufa.



Figura 15 - Culturas de bromélia cultivada em processos de biorreatores de imersão temporária e a seqüência de formação, determinação e regeneração dos explentes. LFDGV, Fitotecnia, UFSC/CCA, 2001.

c) Absorção de nutrientes

Plantas *in vitro* quase sempre produzem raízes não funcionais, ou seja, não apresentam capacidade de absorção de água e nutrientes quando colocadas em contato com o solo. As plântulas *in vitro* ao serem aclimatizadas, passam de um meio onde têm à disposição alta concentração de nutrientes para um substrato no qual são forçadas a iniciar o processo de absorção de sais para seu desenvolvimento. A emissão de novas raízes é muito importante, pois as formadas *in vitro* têm pouca capacidade de absorção e não respondem imediatamente ao momento do transplante, além de serem pouco funcionais, delicadas e propensas ao ataque de microorganismos.

d) Doenças

Problemas de doenças podem facilmente aparecer nas culturas que são levadas às casas de vegetação, pois a falta de pressão de inoculo e a dependência do meio não estimulou as plantas a desenvolver o sistema de defesa contra microrganismos. A fragilidade da plântula *in vitro* aliada à alta umidade relativa, na qual é aclimatizada, favorece o crescimento de fungos e bactérias. É essencial, portanto, que se faça uma prevenção de doenças para o sucesso do transplante, durante e após a aclimatização.

7.2. FATORES QUE AFETAM A ACLIMATIZAÇÃO

- 1) As plantas micropropagadas devem ser sadias e apresentarem baixo inoculo de patógenos.
- 2) A manutenção da alta umidade relativa, por alguns dias após o transplante, é considerada ponto crítico para a sobrevivência das plântulas. Um número significativo de laboratórios comerciais tem evitado o uso de um sistema automático de irrigação para este propósito, por tornar o meio excessivamente úmido, favorecendo o crescimento de fungos e algas. O sistema preferencial é o "fogging" ou nebulização são os mais indicados.
- 3) Inicialmente é necessário fornecer baixas quantidades de luminosidade e irradiância para as plântulas. Quando submetidas ao aumento de luz sofrem um processo de destruição das moléculas de clorofila, tornando-se cloróticas e queimadas. Para evitar esses problemas, as plântulas podem ser removidas gradualmente, para uma intensidade de luz sob a qual manterá seu crescimento;
- 4) A temperatura da aclimatização deve ser tão próximo a que estava no ambiente, podendo ser gradualmente ajustada com o decorrer do tempo.
- 5) O pH do solo deve ser apropriado para cada espécie. Fertilidade e porosidade para promover drenagem adequada e aeração;
- 6) Fornecer volume adequado da área de enraizamento, conforme cada espécie.
- 7) Para a fertilização muitos laboratórios adicionam, periodicamente, macro e/ou micronutrientes no substrato em que as plântulas são transplantadas;
- 8) Normalmente, antes do transplante, as plântulas são lavadas, de preferência, com água morna para retirada total do meio de cultura e plantadas em substrato esterilizado. Alguns autores recomendam a lavagem das plântulas com solução fungicida, enquanto outros, não aconselham seu uso durante as primeiras duas semanas depois do transplante, pois podem ser fitotóxicos nesta fase.

8. ENRAIZAMENTO

O enraizamento é uma etapa que define o resultado final da microropagação, é a etapa onde ocorre a formação de raízes adventícias nas partes aéreas. Pode ser dividido em indução, iniciação e alongamento das raízes (Torres, 1998). Pode ser realizada *in vitro* como no ambiente externo, porém resultados mais satisfatórios para a maioria das espécies, tem sido obtidos no enraizamento *ex vitro*. A opção por um dos sistemas depende da qualidade da estaca, da espécie de trabalho, das condições do laboratório e dos recursos disponíveis. Pode-se também criar um terceiro sistema, onde as estacas são mantidas *in vitro* até a indução da rizogênese e, posteriormente, são transplantadas em um substrato *ex vitro* para desenvolvimento das raízes.

É necessário que se tenham formados estacas da espécie de trabalho, com folhas e outros tecidos diferenciados, para a indução e formação das raízes. O enraizamento é variável de espécie para espécies e de acordo com o tratamento hormonal aplicado. O uso de auxinas favorece a indução e a iniciação radicular e inibe o alongamento, porém concentrações elevadas podem levar à formação de calos. Para a indução de enraizamento o método mais utilizado é o uso de pulsos de auxina (normalmente, AIB na concentração de 500 a 1000 ppm em 1 a 5 min⁻¹ para estacas lenhosas) na base da estaca. Espécies herbáceas e regiões jovens das plantas geralmente enraízam mais facilmente que espécies lenhosas e regiões mais maduras.

8.1. ENRAIZAMENTO *IN VITRO*

A vantagem deste tipo de enraizamento é o melhor controle das condições em que se trabalha e, com isso, a obtenção de um alto percentual de enraizamento.

Por outro lado, a desvantagem do método é que as raízes formadas *in vitro* nem sempre são eficientes na absorção de água e de nutrientes, no momento da passagem das mudas para o substrato. Raízes produzidas *in vitro* podem possuir poucos pêlos radiculares e conexões vasculares, e só comecem a desenvolver o câmbio secundário quando são removidas do frasco de cultura.

O enraizamento *in vitro* pode ocorrer de duas formas: quando as raízes são formadas a partir de brotações sendo chamado de processo direto, e quando são formadas a partir de calo, denomina-se de processo indireto. Em ambos os casos, se não houver uma ligação vascular eficiente entre a parte aérea e a parte subterrânea, a aclimatização da muda é dificultada, podendo comprometer sua sobrevivência.

A rizogênese está associada à ação de reguladores de crescimento (internos e externos), principalmente nas fases iniciais da indução da formação das raízes. Algumas espécies, contudo, já possuem um nível endógeno de fitormônios suficiente e só enraízam na ausência de qualquer tipo de regulador, podendo ou não necessitar apenas de uma pequena lesão na base da estaca.

Auxinas como o AIB (ácido indolbutírico), AIA (ácido indolacético) e ANA (ácido naftalenoacético) são os principais reguladores envolvidos no processo de enraizamento *in vitro*.

Em alguns casos, a concentração de auxina que promove bom enraizamento não é a mesma que promove uma alta sobrevivência *ex vitro*. As concentrações mais utilizadas para induzir rizogênese normalmente estão entre 1,0 - 10,0 mg.L⁻¹ para AIA, 0,05 - 1,0 mg.L⁻¹ para ANA e 0,5 - 3,0 mg.L⁻¹ para AIB (Soares et. al., 2001). A análise do método de enraizamento deve levar em consideração o resultado final, ou seja, o número de mudas produzidas e a qualidade fisiológica das plântulas, que na maioria das vezes é dependente do método de indução e fitorregulador usado. A auxina deve ser aplicada no meio de cultura ou anteriormente à inoculação do explante (no caso de enraizamento *ex vitro*), levando-se em conta que a sua concentração é inversamente proporcional ao tempo de permanência com o regulador.

Associadas às auxinas, outras substâncias também interferem de forma direta ou indireta no enraizamento dos explantes. Poliaminas, ácido sulfúrico, cloreto de magnésio e compostos fenólicos, como o floroglucin, atuam, por exemplo, estimulando a síntese de AIA ou liberando a auxina existente no explante. Já as citocininas, geralmente utilizada para estimular a formação de brotações, costumam inibir o enraizamento. Existem poucos casos em que uma citocinina não interfere ou estimula a formação das raízes. As giberelinas funcionam como as citocininas, inibindo, na maioria das vezes, a rizogênese.

Fatores ambientais, tais como tamanho dos recipientes de inoculação, meio de cultura, gases, substratos, luz, temperatura e o próprio explante, também afetam a formação de raízes. O tamanho dos frascos onde os explantes são colocados ajuda ou dificulta a formação e o crescimento das raízes, no momento em que se tornam uma barreira física (Soares et. al, 2001). Em frascos maiores se torna mais fácil conseguir o enraizamento. A concentração de sais no meio de cultura pode ser regulada de acordo com cada espécie, de forma que a redução da concentração iônica dos meios (50% ou 75% da força total do meio) pode favorecer esta etapa do processo de micropropagação.

8.2. ENRAIZAMENTO EX VITRO

A técnica de enraizamento *ex vitro* consiste em destacar brotações e plantá-las no substrato desejado, que pode ser: turfa, areia, vermiculita, perlita, bandejas de espuma fenólica e ou substratos comerciais, ainda solo esterilizado. As estacas não podem ser nem muito grandes, nem muito pequenas, pois esses extremos são de difícil manuseio, dificultam o enraizamento e demandam mais tempo para formar mudas. Estacas de tamanho entre 2 e 5 centímetros são as ideais. Se possível, o plantio deve ser em grupos, ao invés de isoladas, o que favorece o enraizamento, que, geralmente, ocorre em 2 a 5 semanas.

A principal vantagem do enraizamento *ex vitro* é o menor custo financeiro que esta técnica proporciona. As estacas brotadas, ao invés de serem inoculadas em meios de cultura com reguladores propícios ao enraizamento, são enraizadas fora das condições assépticas dos frascos de cultura, já fazendo parte da etapa seguinte, a aclimatização.

Calcula-se que os recursos economizados por esta técnica, cheguem a 75% dos gastos totais, o que corresponde justamente aos gastos com mão-de-obra e materiais apenas para esta etapa da micropropagação. Como um dos grandes problemas da cultura de tecidos de plantas são os gastos com a produção, esta alternativa é muito importante para obter uma produção com baixos custos.

O enraizamento *ex vitro* reduz o tempo de cultivo e de comercialização da muda, pois elimina uma etapa do processo de micropropagação, misturando as etapas de enraizamento e aclimatização.

No entanto, o enraizamento *ex vitro* não possui apenas vantagens. Em algumas espécies, a taxa de enraizamento *ex vitro* é tão baixa, que a utilização deste processo é inviável. Em outras, a estaca, antes do enraizamento, necessita de passar por uma etapa chamada de "endurecimento", para conseguir sobreviver ao ambiente adverso da fase de aclimatização. A alta sensibilidade das estacas requer cuidados especiais para enraizar.

As condições de aclimação que favoreçam o endurecimento sempre são positivas para o número final percentual de enraizamento.

Devido ao substrato ser mais poroso e melhor arejado, as raízes formadas são mais funcionais e eficientes na absorção de água e nutrientes. Isso aumenta o número de sobreviventes na aclimatização e também diminui o tempo de formação da muda. Se necessário e de acordo com a espécie micropropagada, pode-se enriquecer o substrato com sais, do meio de cultura nutritiva ou reguladores de crescimento como auxinas, que aumentam a intensidade e a velocidade do enraizamento. Estes reguladores podem ser aplicados diretamente no substrato ou na passagem das estacas do tubo de cultura para o substrato.

8.3. FATORES DEPENDENTES DA PLANTA

a) Genótipo – em muitas espécies é um fator controlado geneticamente. Na prática, este fator pode ser manipulado ou diminuído, mediante uma série de mediadas aplicadas, visando a manifestação de atividades bioquímicas e fisiológicas do explante, provocando variações ambientais para as condições de enraizamento.

b) Estresse hídrico – provoca o aumento do conteúdo de ABA e etileno nas folhas, compostos inibidores de enraizamento. Também afeta o níveis endógenos de citocinina, uma vez que o interesse é nas raízes. Um fator para diminuir o estresse hídrico é diminuir gradativamente a umidade relativa do ar nos frascos *in vitro*.

c) Carboidratos – a maior influência dos carboidratos está ligada a relação C/N. valores entremos desta relação são desaconselháveis (Torres, 1998). Assim, a redução da disponibilidade de nitrogênio na maioria dos casos aumenta consideravelmente o taxa de enraizamento. Também em algumas espécies lenhosas um pré tratamento com elevadas doses de açúcar também favorecem.

d) Nutrição mineral – o estado nutricional da planta influencia diretamente a taxa de enraizamento. Restrição em potássio, fósforo, magnésio e cálcio tendem a afetar os processos de rizogênese. O cálcio é um ativador de peroxidases, uma enzima que parece ser essencial para os processos de enraizamento (Hassig, 1986; Torres, 1998). Normalmente, plantas deficientes em nitrogênio tendem a enraizar melhor.

e) Condições de crescimento da planta – fatores de estiolamento fazem a indução de sinalização de auxinas. O estiolamento é consequência de cultivos em ambientes com baixa luminosidade. Apesar de que o local de enraizamento deva ser escuro, é necessário que a parte aérea tenha um bom padrão de luminosidade para a produção de auxinas promotoras de enraizamento.

f) Idade fisiológica – explantes juvenis apresentam maior facilidade de enraizamento, uma vez que, os tecidos novos são mais responsivos.

8.4. FATORES RELACIONADOS AO EXPLANTE

a) Estação do ano – certas espécies apresentam propensão ao enraizamento o ano todo, porém, principalmente plantas que apresentam estágios hibernais o processo é facilitado nos períodos que acontece a quebra de dormência seguido de pouco espaço de tempo após.

b) Presença e número de folhas – algumas espécies são dependentes da presença de folhas, funcionam como reserva de compostos nitrogenados, sacarose e auxinas. O número de folhas influencia a velocidade de enraizamento.

c) Posição do explante na planta matriz – o teor endógeno de hormônios, promotores ou inibidores, varia com a idade fisiológica e cronológica dos tecidos. Deste modo tecidos de um mesma planta pode apresentar respostas morfogenéticas diferentes.

d) Meio nutritivo na fase de multiplicação – efeito de GA3 e BAP do meio de cultivo, podem provocar baixas taxas de enraizamento, por outro lado pré tratamentos com auxinas podem reverter este fator.

e) Inibidores endógenos – substância fenólicas produzidas pela resposta aos ferimentos e liberadas nestas regiões podem diminuir sensivelmente a taxa de enraizamento.

8.5. FATORES LIGADOS AO MEIO DE ENRAIZAMENTO

a) Reguladores de crescimento – auxinas sintéticas e naturais podem sozinhas promover o enraizamento. Contudo, a concentração a ser aplicada é variável de espécie para espécie, em algumas não há necessidade. Os reguladores de crescimento mais utilizados são: AIB e ANA, em menor grau de uso, 2,4 D e 2,4,5 T.

b) Outras substâncias – compostos fenólicos apresentam relação sinérgicas com a as auxinas (Torres, 1998). Os carboidratos fornecem energia, existindo a disponibilidade no meio, há a necessidade de formação de raízes para a receptação destes. O fornecimento de sais minerais é sempre necessária, principalmente P, K, Ca e Mg. O boro tem sido considerado muitas vezes, um dos mais importante fator de crescimento para muitas espécies. Espécies lenhosas são beneficiadas com o usos de carvão ativado quando do enraizamento *in vitro*.

c) Estado físico da cultura – a passagem de um gradiente líquido para sólido-poroso é dramático para a cultura, um balaço mais adequado do estado físico dos meios favorece o processo.

d) pH – o mais adequado para a maioria das culturas é que seja próximo de 6,5 a 7,0, porém é sempre necessário estar próximo daquele que se encontrava na fase anterior, caso a cultura estiver desenvolvendo bem.

e) Condições de incubação – a luz influencia na regulação da morfogênese e atua com fonte de energia para a realização da fotossíntese (Hartmann & Kester, 1983; Torres, 1998). Na rizogênese a irradiância e o fotoperíodo são determinantes, vale aplicar este balanço de acordo com cada espécie. A luz favorece o desenvolvimento de partes aéreas e o escuro a rizosfera.

9. APLICAÇÕES DAS TÉCNICAS DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS PARA O MELHORAMENTO

As principais aplicações das técnicas de cultura de tecidos vegetais podem ser sumarizadas nas seguintes:

a) Cultura de meristemas

Técnica mais antiga para a propagação clonal massal e para a obtenção de plantas livres de vírus, principalmente quando combinada com a técnica de termoterapia. Esta técnica é relativamente simples e aplicável a um grande número de espécies. Também considerando o fato de que as células do meristema apical caulinar são menos diferenciadas que as demais, a cultura de meristemas permite a obtenção de uma progênie clonal geneticamente idêntica à planta matriz, permitindo a captura e fixação de ganhos genéticos. Além disto, considerando os atributos destes meristemas eles tornam-se alvos ideais para a conservação in vitro de germoplasma e o intercâmbio internacional de germoplasma.

b) Avaliação rápida de suscetibilidade

A cultura de células, tecidos e órgãos pode ser empregada para a avaliação de suscetibilidade/tolerância à várias moléstias ou estresses abióticos. Esta avaliação somente será útil quando tecidos e órgão responderem de forma similar às respostas da planta inteira.

c) Indução de florescimento precoce

Esta técnica é empregada para reduzir o longo período de juvenilidade que ocorre principalmente nas plantas perenes, permitindo uma redução substancial de tempo nos programas de melhoramento genético.

d) Reversão de fases de desenvolvimento

Em plantas arbóreas, florestais e frutíferas, a seleção de plantas elite é baseada nos espécimes mais velhos e comprovadamente saudáveis e produtivos. A propagação vegetativa convencional destas plantas torna-se dificultada. O cultivo in vitro continuado pode restaurar a juvenilidade nestes genótipos facilitando a propagação clonal massal.

e) Embriogênese somática

Células vegetais são consideradas totipotentes uma vez que possuem o potencial de regenerar uma planta completa. O padrão ideal de produção de plantas a partir de células simples é por meio da embriogênese somática, onde, as células são objeto de mudanças de estrutura e organização, similares aquelas que ocorrem durante a embriogênese zigótica. Embriões somáticos são produzidos em um grande número de espécies, mas ainda não há segurança quanto à estabilidade genética e uniformidade fenotípica das plantas regeneradas por esta técnica. A embriogênese somática têm sido a técnica empregada como sistema regenerativo preferencial para a transformação genética (figura 17).

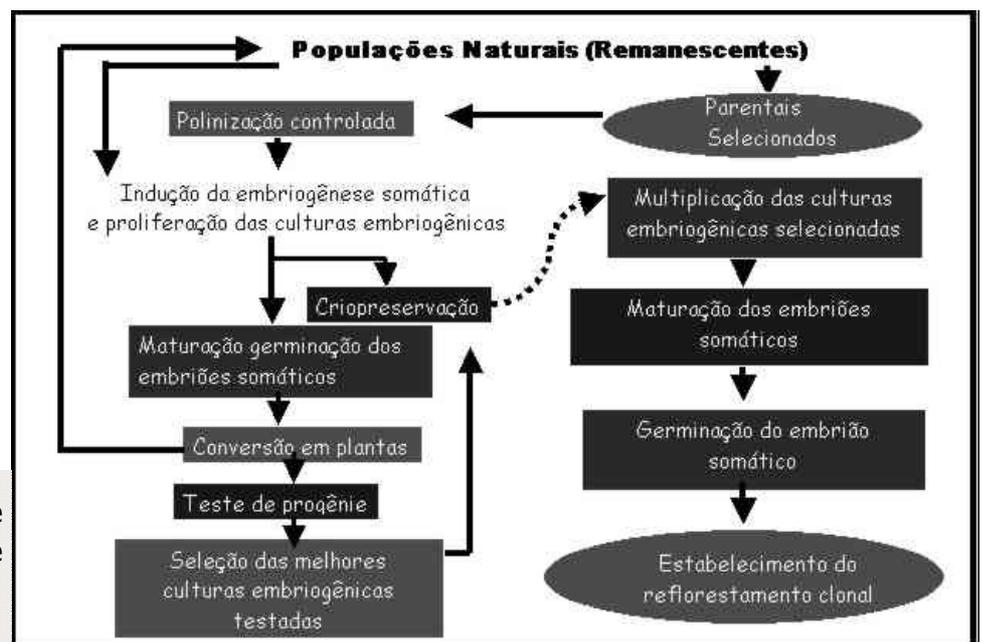


Figura 17 - Integração de embriogênese somática em um programa conservação e ou melhoramento genético

f) Haplodiploidização

A descoberta de Guha e Maheshwari (1964) de que anteras de *Datura innoxia* cultivadas in vitro podiam regenerar plantas haplóides trouxe grande impacto para a aplicação de técnicas biotecnológicas ao melhoramento de plantas. Esta técnica baseia-se na rediferenciação de células gametofíticas gerando embriões ou calos. Embora preferindo-se a formação de embriões somáticos como rota regenerativa para a obtenção de haplóides geneticamente estáveis, a formação de calos também pode ocorrer, particularmente em cereais. Após a obtenção dos haplóides a di-haplodiploidização pode ocorrer espontaneamente ou como resultado do tratamento com colchicina. A principal vantagem é a obtenção de linhas homocigotas homogêneas rapidamente.

g) Variação somaclonal

O ambiente da cultura in vitro pode induzir variabilidade nas culturas e este fenômeno, primeiramente observado por Larkin & Scowcroft (1981), foi denominado de variação somaclonal. A variabilidade gerada desta maneira pode ser importante para o melhoramento genético.

h) Cruzamento amplos

A ampliação da base genética para o melhoramento de plantas pode envolver cruzamentos interespecíficos e intergenéricos.

Por exemplo, *Atylosia*, um gênero taxonomicamente próximo à *Cajanus*, apresenta espécies com características desejáveis, como resistência a moléstias e insetos e tolerância à salinidade e seca. Algumas espécies de *Atylosia* hibridizam com *Cajanus*, enquanto que outras não. Mesmo após cruzamentos bem sucedidos, ocorrem barreiras de pós-fertilização, como o não desenvolvimento do endosperma e a subsequente degeneração do embrião híbrido. Nestes casos, o resgate e a cultura de embriões pode facilitar a obtenção de híbridos viáveis.

Além de permitir uma nova fonte de variabilidade genética, a hibridização ampla tem se mostrado como técnica promissora para a produção de plantas haplóides via eliminação seletiva de cromossomos, sendo conhecida como ‘técnica bulbosum’. Assim, quando *Hordeum vulgare* é empregada como mãe em cruzamentos com *H. bulbosum*, após a polinização e fertilização, o embrião resultante pode ser haplóide uma vez que o conjunto cromossômico de *H. bulbosum* pode ser seletivamente eliminado.

i) Hibridização somática/fusão de protoplastos

Esta técnica, descrita inicialmente por Carlson et al. (1972), pode ser considerada uma forma de engenharia genética. Nela, protoplastos são isolados e fundidos, envolvendo interações nucleares e citoplasmáticas. A hibridização somática produz híbridos nucleares ou híbridos citoplasmáticos (cíbridos) e sua eficiência depende do controle dos vários estágios da técnica: isolamento e fusão, identificação e seleção dos heterocariontes e células híbridas e a regeneração de plantas. A fusão de protoplastos de diferentes origens pode ser quimicamente induzida com o auxílio de um agente indutor, como o polietileno glycol (PEG) ou eletricamente induzida (eletrofusão).

A fusão somática também pode permitir aos melhoristas a manipulação de características extracromossômicas, como a macho-esterilidade. O procedimento resulta na união do citoplasma dos genitores, enquanto que nos cruzamentos sexuais apenas a mãe contribui com o citoplasma. Assim, a fusão de protoplastos pode permitir a obtenção de híbridos contendo diferentes tipos de citoplasma, o que não pode ser obtido pelos métodos convencionais.

A hibridização somática também pode ser empregada para superar algumas das limitações inerentes aos cruzamentos amplos que ocorrem entre espécies ou gêneros divergentes. A maior restrição desta técnica refere-se, contudo, ao desbalanceamento genômico, perda de cromossomos não pareados ou falta de fusão nuclear. Mesmo quando a fusão ocorre, pode ocorrer a perda seletiva de cromossomos e o desbalanceamento nuclear resultante pode reduzir a viabilidade e o potencial regenerativo. Esta tem sido a principal limitação para a aplicação desta técnica para o melhoramento genético de plantas.

10. PERSPECTIVAS PARA A APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

a) CURTO PRAZO:

Propagação massal de genótipos superiores a partir de:

- Pequena quantidade de sementes
- Genótipos-elite
- Material limitado de plantas raras ou ameaçadas de extinção
- Híbridos obtidos em cruzamentos

Conservação de germoplasma in vitro

b) MÉDIO E LONGO PRAZO:

- Aumento do ganho genético por capturar ou explorar a variância total em comparação ao componente aditivo dos programas convencionais de melhoramento (baseados principalmente em seleção recorrente).
- Melhoria dos protocolos para a embriogênese somática visando o "scale-up", a obtenção de sementes sintéticas e a diminuição do custo em comparação ao seedling obtido por métodos convencionais.
- Propagação massal de plantas a partir de: hibridação somática, variantes somaclonais e por técnicas de DNA recombinante.

11. ESPÉCIES E TECNOLOGIAS EMPREGADAS

A seguir são listados alguns exemplos de espécies vegetais e respectivas tecnologias cujo emprego já é corrente:

- **Dendzeiro:** primeiro projeto no qual plântulas originadas a partir de embriogênese somática foram cultivadas a campo, (Unilever, Malasia, 1975).
- **Coníferas:** primeiro projeto no qual tecnologias de poliembriogênese somática desenvolvidas e patenteadas pela Universidade da Califórnia-Davis foram transferidas para empresas de reflorestamento (Weyerhaeuser, Washington, USA), para a clonificação de genótipos superiores resultantes de programas convencionais de melhoramento genético.
- **Eucaliptos:** organogênese, embriogênese somática (USA, Europa). Microestacas (Brasil): aumento de 135% na produtividade de polpa a partir de clones selecionados em comparação a população base.
- **Pyrus, Malus, Prunus:** Limpeza viral e micropropagação (cultura de meristemas e de segmentos nodais) para a propagação massal de porta-enxertos e para o estabelecimento de variedades-copa matrizes sadias.
- **Videira:** embriogênese somática e organogênese para a propagação massal de porta-enxertos e variedades-copa isentas de moléstias.
- **Bananeira:** regeneração em larga escala de mudas isentas de pragas moléstias. Obtenção de variantes somaclonais e de mutagênese in vitro para resistência ao mal do Panamá e Sigatoka-negra. Atualmente a maior parte dos bananais da América Central e do Caribe são instalados com mudas micropropagadas produzidas em Biofábricas desenvolvidas para este fim, principalmente em Cuba.
- **Moranginho, abacaxizeiro, alho, cebola, batatinha, mandioca:** Obtenção de plantas matrizes isentas de viroses, pela aplicação da técnica de cultura de meristemas e subsequente micropropagação massal. Indução e obtenção de variantes somaclonais e mutagênese in vitro para ampliação da base genética e melhoramento genético.
- **Tomateiro:** variantes somaclonais e transformação genética para coloração e conservação. DNAP e Calgene (USA). Primeira autorização de liberação para cultivo comercial de produto transgênico dada pelo FDA americano, em 1994.
- **Citros, mamoeiro e mangueira:** modelos embriogênicos. Melhoramento e plantas isentas de moléstias.
- **Brassica sp:** resgate de embriões resultantes de cruzamentos incompatíveis, ativação de embriogênese somática e encapsulamento para a obtenção de sementes sintéticas. Sakata Seed Co., Japão.
- **Cacau e café:** embriogênese somática para a propagação massal de variedades melhoradas e resistentes a moléstias (EUA e Costa Rica).

12. VANTAGENS DA MICROPROPAGAÇÃO EM PLANTAS PERENES

Técnicas de cultura de tecidos vegetais, podem se transformar em ferramentas auxiliares eficazes para o melhoramento de plantas perenes. Algumas vantagens são listadas a seguir:

- Como a multiplicação massal de um genótipo superior é possível em qualquer estágio de um programa de melhoramento, a micropropagação tem o potencial de promover o aumento de ganhos genéticos em apenas uma geração;
- A propagação massal pela clonificação de genótipos superiores captura os componentes aditivos e não aditivos da variância genética;

- c) Genes desejáveis de clones selecionados podem ser mantidos em um banco genético na forma de pomares clonais, onde podem ser recombinados através de cruzamentos dirigidos;
- d) Interações genótipo-ambiente podem ser melhor estudadas em populações clonais;
- e) A seleção clonal in vitro e a micropropagação podem ser utilizadas para a produção de genótipos superiores e o tempo necessário para produzir grandes quantidades de plantas é menor no programa clonal do que em um programa baseado nos pomares clonais;
- f) Técnicas de micropropagação possibilitam a produção de um grande número de progenitores geneticamente uniformes para a produção de sementes híbridas.

13. LIMITAÇÕES

Mesmo considerando-se as diversas aplicações, ainda existem limitações para a aplicação mais ampla destas técnicas no melhoramento de plantas:

- a) Em muitos sistemas de cultura de tecidos a variação introduzida é epigenética e, portanto, limitante para o melhoramento de plantas.
- b) Variações deletéreas como redução na fertilidade e fixação de frutos e sementes e outras variações morfológicas ocorrem em variantes somaclonais, com várias implicações no melhoramento de plantas, principalmente quando a uniformidade genética é o objetivo.
- c) O sucesso de um sistema regenerativo in vitro é substancialmente dependente da adequação de um meio de cultura apropriado para cada espécie.
- d) O desenvolvimento de eixos caulinares, gemas e embriões somáticos não é, em geral, sincronizado, dificultando a aplicação de sistemas-biofábricas.

14. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A possibilidade de uma adequada manipulação da morfogênese in vitro para a obtenção de processos regenerativos via organogênese ou embriogênese somática parece ser dependente de condições determinativas e permissivas. Nas primeiras salientam-se a "condição fisiológica do explante" e o tipo e concentração do regulador de crescimento a ser utilizado como sinal químico para a indução/ativação da morfogênese. De maneira geral, quanto mais juvenil for o tecido doador de explantes e quanto mais meristemática for sua condição, maiores serão as possibilidades de se orientar a morfogênese in vitro. Para a embriogênese somática, restam poucas dúvidas de que tecidos embrionários são os mais adequados para a extração de respostas nesta rota, apesar de que nem sempre estes tecidos são os mais interessantes para os propósitos a serem obtidos. Com respeito aos reguladores de crescimento, a sua ação para a obtenção de respostas organogenéticas relaciona-se aos padrões apontados por Skoog e Miller (1957), isto é, balanços favoráveis as citocininas tendem a induzir organogênese aérea enquanto que balanços favoráveis as auxinas favorecem a rizogênese. Para a ativação/indução da embriogênese somática a adição de auxinas fortes ao meio de cultura primário parece ser uma condição essencial para o desencadeamento de reações metabólicas associadas com esta rota, apesar de que o balanço entre fontes nitrogenadas orgânicas e inorgânicas, oxidadas e reduzidas parece exercer considerável influência. As chamadas condições permissivas incluem a composição geral dos meios de cultura e as condições físicas, tais como temperatura e fotoperíodo.

A utilização de técnicas de cultura de tecidos para a regeneração e propagação massal de genótipos superiores via organogênese e embriogênese somática é prática rotineira em muitos laboratórios. Algumas limitações dizem respeito a necessidade de melhoria geral dos protocolos utilizados e a definição e estabelecimento de protocolos para as chamadas espécies "recalcitrantes". Ênfase especial deve ser dada a possibilidade de estabelecimento de suspensões celulares morfogenéticas. Um maior detalhamento das técnicas de biologia celular e molecular vem permitindo um maior refinamento das técnicas de cultura de tecidos vegetais e a conseqüente aplicação para tecnologias de protoplastos e transformação genética.

15. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ammirato, P. G. V. 1993. Embryogenesis, in: Evans, D. A.; Sharp, W. R.; Ammirato, P. G. V.; Yamada, Y. Handbook of plant cell culture. New York: MacMillan Publisher Company, v.1, 123p.
- Button, J. & Kochba, J. 1977. Tissue culture in the citrus industry. In: Plant cell, tissue and organ culture. Reinert, J. & Bajaj, Y.P.S. (eds.). pp. 70-92. Springer-Verlag. Berlin.
- Cocking, E.C. 1960. A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature*, 187:962-963.
- Christianson, M.L. 1985. An embryogenic culture of soybean: towards a general theory of somatic embryogenesis. In: Tissue Culture in Forestry and Agriculture. Henke, R.R.; Hughes, K.W.; Constantin, M.J.; Hollaender, A. (eds). pp. 83-103. Plenum Press. New York.
- Debergh, P.C. & Read, P.E. 1991. Micropropagation. In: Micropropagation Technology and Application. Debergh, P.C. & Zimmermann, R.H. (eds.). pp. 3-13. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- Durzan, D. & Gupta, P.K. 1988. Somatic embryogenesis and polyembryogenesis in conifers. In: Biotechnology in Agriculture. Mizrahi, A. (ed.). pp. 53-81. Allan Liss. New York.
- George, E. F. 1996. The derivation, preparation, and use of culture media, In: Plant propagation by tissue culture. Exegetics, Edington. X, p. 344-419.
- George, E. F. 1996. Embryogenesis: Plant propagation by tissue culture. Exegetics, Edington. VII, p. 612-623.
- George, E. F. 1996. Plant grow regulators: Plant propagation by tissue culture. Exegetics, Edington. XI, p. 420-479.
- George, E. F. 1996. Plant propagation and micropropagation: Plant propagation by tissue culture. Exegetics, Edington. II, p. 37-66.
- George, E. F. 1996. Plant tissue culture techniques: Plant propagation by tissue culture. Exegetics, Edington. I, p. 3-36.
- Guerra, M.P. and Handro, W. 1988. Somatic embryogenesis and plant regeneration in embryo cultures of *Euterpe edulis mart.* (palmae). *Plant Cell Reports*, 7:550-552.
- Guerra, M.P.; Torres, A.C.; Teixeira, J.B. 1999. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. (eds.). *Culturas de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília, Embrapa-CBAB. pp. 533-568. V.2.
- Gupta, P.K. & Durzan, D.J. 1986. Somatic polyembryogenesis from callus of mature sugar pine embryos. *Biotechnology*, 4:643-45.
- Haccius, B. 1978. Question of unicellular origin of non-zigotic embryos in callus cultures. *Phytomorphology*, 28:74-81.
- Harmann, H.T. & Kester, D. 1975. *Plant propagation: principles and practices*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J.
- Hartmann, T.H.; Kester, D.E.; Davies, F.T. 1990. *Plant Propagation, Principles and practices*. Prentice Hall. New Jersey. 647 p.
- Krikobian A. D., 1993. Prpagacion clonal in vitro. In Roca W., Mroginski L. A. (eds) *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. CIAT – Cali, Colombia. Cap 11, p. 95-117.
- Litz, C. 1987. Application of tissue culture to tropical fruits. In: *Plant Tissue and Cell Culture*. Green, C.C.; Somers, D.A.; Hackett, W.P.; Biesboer, D.D. (eds.). pp.407-18. Allan R. Liss. New York.
- Lutz, J.D.; Wong, J.R.; Rowe, J. 1985. Somatic embryogenesis for mass cloning of crop plants. In: *Tissue culture in forestry and agriculture*. Henke, R.R.; Hughes, K.W.; Constantin, M.J.; Hollaender, A. (eds). pp.105-16. Plenum Press. New York.
- Miller, C.O.; Skoog, F.; Okumura, F.S.; Von Saltza, M.; Strong, F.M. 1955. Structure and synthesis of Kinetin. *J. Am. Chem. Soc.* 77:2662-63
- Mullins, M.G. 1987. Propagation and genetic improvement of temperate fruits, the role of tissue culture. In: *Plant Tissue and Cell Culture*. Green, C.C.; Somers, D.A.; Hackett, W.P.; Biesboer, D.D. (eds.). pp.395-406. Allan R. Liss. New York.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Phys.*, 25:135-66.
- Murashige, T. 1977. Clonal crops through tissue culture. In: *Tissue Culture and its bio-technological application*. Barz, W.; Reinhard, D.E.; Zenk, M.H. (eds). pp. 392-403. Springer-Verlag. Berlin.
- Neumann, K. H. 2000. Some study on somatic embryogenesis, a tool in plant biotechnology. 87 th. Indian Science Congress. <http://bibd.uni-grtessen.de/gdoc//2000/uni/poooo4.pdf>. Acessado 10 ago. 2004.
- Pence, V.C.; Hasegawa, P.M.; Janick, J. 1979. Asexual embryogenesis in *Theobroma cacao* L. *Jour. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 104(2):145-48.
- Peters, J. A. 1986. Utilização de biotecnologia no melhoramento de fruteiras. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 8(3):19-22.

- Reinert, J. 1959. Über die Kontrolle die Morphogenese und die Induktion von Advetiveembryonem an gewebeulturen aus karotten. *Planta*, 53:318-33.
- Roca W., Nuñez V. Morman K. 1993. Cultivo de anteras y mejoramiento de plantas. Roca W., Mroginski L. A. (eds) Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. CIAT – Cali, Colombia. Cap 11, p. 271-279.
- Roca W., Nuñez V. Morman K. 1993. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro. Roca W., Mroginski L. A. (eds) Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. CIAT – Cali, Colombia. Cap 11, p. 19-36.
- Santiago, E. J. A.; Paiva, R.; Paiva, P. D. O.; Santana, J. R. F.; Gomes, G. A. C. 2001; Aclimatização: Cultura de tecidos. Paiva e Paiva, UFLA, Lavras, M.G. 7:64-67.
- Santiago, E. J. A.; Paiva, R.; Paiva, P. D. O.; Santana, J. R. F.; Gomes, G. A. C. 2001; Meios de cultura: Cultura de tecidos. Paiva e Paiva, UFLA, Lavras, M.G. 3:22-35.
- Santiago, E. J. A.; Paiva, R.; Paiva, P. D. O.; Santana, J. R. F.; Gomes, G. A. C. 2001; Multiplicação: Cultura de tecidos. Paiva e Paiva, UFLA, Lavras, M.G. 5:50-57.
- Santos, R. B.; Paiva, R.; Paiva, P. D. O.; Santana, J. R. F., 2001; Problemas no cultivo in vitro: Cultura de tecidos. Paiva e Paiva, UFLA, Lavras, M.G. 9:73-79.
- Sinnot, E.W. 1960. *Plant Morphogenesis*. McGraw-Hill, New York.
- Skoog, F. & Miller, C.O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp. Soc. for Exp. Biol.*, 11:118-31.
- Soares, A. S.; Paiva, R.; Paiva, P. D. O.; Santana, J. R. F.; Paiva, L V. 2001; Enraizamento, In: Cultura de tecidos. Paiva e Paiva, UFLA, Lavras, M.G. 6:58-63.
- Sondahl, M.R. & Monaco, L.C. 1981. In vitro methods applied to coffee: *Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture*. Thorpe, T.A. (ed.). pp. 325-47. Academic Press. New York.
- Steward, F.C.; Mapes, M.O.; Mears, K. 1958. Growth and organized development of cultured carrots. II. Organization in cultures from freely suspended cells. *Amer. Jour. Bot.*, 45:705-8.
- Street, H.E. 1977. Cell (Suspension) Cultures - Techniques. In: *Plant Tissue and Cell Culture*. Street, H.E. (ed.). pp. 61-102. University of California Press. Berkeley and Los Angeles.
- Tisserat, B. 1979. Tissue culture of the date palm. *J. Hered.*, 70:221-222.
- Thrope T. A.; Vilalobos V. M., 1993. Micropropagacion: conceptos, metodología y resultados. In Roca W., Mroginski L. A. (eds) Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. CIAT – Cali, Colombia. Cap 11, p. 127-138.
- Thorpe, T.A. 1980. Organogenesis in vitro: structural, physiological, and biochemical aspects. In: *Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture*. Vasil, I.K. (ed.). pp. 71-111. Academic Press. New York.
- Vasil, I.K.; Ahuja, M.R.; Vasil, V. 1979. Plant tissue culture in genetics and plant breeding. *Adv. Gen.*, 20:127-215.
- Vasil, I.K. 1982. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cereals and grasses. In: *Plant Tissue Culture 1982*. Fujiwara, A. (ed.). pp. 101-103. Maruzen. Tokyo.



**LAB. FISIOLÓGIA DO DESENVOLVIMENTO
E GENÉTICA VEGETAL**

Entre em contato:
Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Agrárias
Rodovia Admar Gonzaga, 1623
Itacorubi, Florianópolis, SC

Tel: (48) 3331-5336
Fax: (48) 3331-5335
Email: lfdgv1@gmail.com

Estamos na Web!

www.cca.ufsc.br/lfdgv

Sobre nossas áreas de atuação:

*As áreas de atuação do LFDGV abrangem a Biotecnologia Vegetal, a Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal e a Genética Vegetal. As principais linhas de pesquisa em andamento vinculam-se à indução e controle da morfogênese in vitro, a cultura de tecidos e micropropagação de plantas, a conservação in vitro de germoplasma, a caracterização da variabilidade genética por meio de marcadores moleculares, a seleção assistida por marcadores, a genômica e proteômica, o sequenciamento genético, a genética de populações e à dinâmica da movimentação de alelos. Vários projetos de pesquisa se encontram em andamento destacando-se aqueles relacionados com espécies nativas, tais como *Euterpe edulis*, *Acca sellowiana*, *Araucaria angustifolia*, *Bactris gasipaes*, *Bromélias*, *Lipia Alba* e *Dicksonia sellowiana*. Espécies exóticas frutíferas também têm sido alvo de estudos e entre essas se destacam os projetos com *Malus domestica*, *Prunus domestica* e *Vitis sp.* As fontes financiadoras incluem agências federais e internacionais de fomento a C&T, bem como a agência estadual de SC (FAPESC) e empresas privadas, destacando-se o Projeto *Geno-Malus* conduzido em parceria com a Associação Brasileira de Produtores de Maçã (ABPM).*