

## Produção de mudas *in vitro* Production of *in vitro* plants

EDUARDO JUN FUZITANI<sup>1</sup> e EDSON SHIGUEAKI NOMURA<sup>2</sup>

A cultura de tecidos pressupõe o cultivo de plantas ou partes de plantas (explantes) em meio de cultura apropriado e asséptico, sob condições de temperatura, umidade, fotoperíodo e irradiância controlados, em sala de crescimento. Engloba, portanto, as técnicas de cultivo de células, tecidos ou órgãos *in vitro*. Todo o material é manuseado em condições assépticas em câmaras de fluxo laminar. Essa técnica tem-se mostrado de enorme importância prática na propagação de espécies de interesse agroflorestal, também conhecida por micropropagação.

Desde que o homem passou a utilizar as espécies vegetais como sua base alimentar, e posterior cultivo, a propagação vegetativa vem sendo utilizada, inicialmente de forma acidental, e posteriormente de forma intuitiva e, finalmente de forma científica.

Em se tratando de cultura de tecidos, este método consiste, na verdade, no cultivo de órgãos, tecidos ou células vegetais em meio nutritivo apropriado, em ambiente asséptico. Baseia-se no fato, amplamente aceito, de qualquer célula do organismo vegetal ser “totipotente”. Isto é, encerrar em seu núcleo toda a informação genética necessária à regeneração de uma planta completa, estando portanto, apta a dar origem, por si só, a uma nova planta, quando submetida a condições adequadas (TEXEIRA, 1983)

### CLONAGEM DE PLANTAS “IN VITRO”

A micropropagação é a modalidade que mais se tem difundido e encontrado aplicações práticas comprovadas, e tem se concentrado na produção comercial de plantas, possibilitando sua multiplicação rápida e em períodos de tempo e espaço reduzidos. Deve-se ter sempre claro que a micropropagação mantém a identidade genética do material propagado, não introduzindo

<sup>1</sup> Engenheiro Agrônomo e responsável técnico do laboratório BIOVALE – Pólo Regional de Desenvolvimento dos Agronegócios do Vale do Ribeira – Departamento Descentralizado de Desenvolvimento – Agência Paulista dos Agronegócios (APTA).

<sup>2</sup> Engenheiro Agrônomo e Pesquisador Científico I – Pólo Regional de Desenvolvimento dos Agronegócios do Vale do Ribeira – Departamento Descentralizado de Desenvolvimento – Agência Paulista dos Agronegócios (APTA).

nenhuma variabilidade genética.

Particularmente na área de plantas ornamentais, onde predominam plantas híbridas (gérbera, cravo, tulipa, orquídeas, dentre outras), a clonagem *in vitro* de matrizes selecionadas tem permitido a uniformização de características, época de floração, coloração, tamanho e forma das flores, dentre outras. A multiplicação *in vitro* pode, em alguns casos, ser obtida em larga escala, resultando na instalação de verdadeiras biofábricas comerciais, baseada no princípio da linha de produção e algumas vezes automatizada.

Como exemplo, a biotecnologia na horticultura é utilizada no estabelecimento de propagação clonal rápida (floricultura, fruticultura, plantas medicinais e silvicultura) na limpeza clonal de plantas de vírus (via cultura de meristemas) e na hibridação ou fusão somática. A hibridação somática é realizada mediante a fusão de protoplastos, permitindo a obtenção de híbridos, superando as barreiras de incompatibilidade sexual. Uma importante contribuição da cultura de tecidos é na conservação de recursos genéticos *in vitro*, estabelecendo-se os chamados bancos de germoplasma. Também se vislumbra no futuro de se utilizar sementes sintéticas, produzidas a partir de embriões somáticos, revestidos ou encapsulados com gel de alginato, contendo nutrientes necessários à nutrição do embrião que dará origem à futura planta.

### ESTABELECIMENTO DAS CULTURAS

Comparativamente às células animais, as células das plantas superiores (produtoras de flores) podem ser consideradas menos diferenciadas, tendo sido esta característica interpretada como uma importante estratégia de sobrevivência para organismos imóveis. Entretanto, isto não significa que possamos regenerar uma planta

inteira de qualquer tecido. Os potenciais de regeneração dependem do tipo de planta, do órgão utilizado e do estágio de desenvolvimento deste. Órgãos jovens são mais suscetíveis à clonagem do que quando maduros, o que significa que, à medida que a especialização progride durante o desenvolvimento do órgão ou da planta, a desprogramação gênica (diferenciação) torna-se mais difícil.

Após a necessária desinfestação das superfícies externas, os explantes são transferidos para os meios de cultura, uma mistura balanceada de macro e micronutrientes (sais minerais), aminoácidos, vitaminas etc., e, obviamente, de uma auxina e uma citocinina em proporções adequadas às finalidades desejadas. A geleificação do meio para efeito de sustentação das culturas é obtida através da adição de agar. Gemas vegetativas e mesmo florais, raízes e embriões somáticos poderão se formar tanto diretamente do explante quanto indiretamente (via proliferação celulares, os chamados calos). De um modo geral, os balanços hormonais mais favoráveis às auxinas promovem a formação de embriões e primórdios de raízes e, quando favoráveis às citocininas, induzem a formação de gemas. Quando apenas gemas são formadas, torna-se necessária a transferência destas para meios indutores de raízes, obtendo-se então uma planta inteira e em condições de ser transferida para a casa de vegetação. Os calos, por serem massas celulares indiferenciadas, permitem também a regeneração *in vitro* com relativa facilidade.

Todos os procedimentos necessários ao manuseio das culturas são realizados sob condições assépticas, fornecidas por equipamentos especiais.

## APLICAÇÃO DA CULTURA DE TECIDOS

Várias têm sido hoje as aplicações das técnicas de biotecnologia celular de plantas, a começar pela clonagem, seu lado mais visível, seguido pela cultura de células (suspensões celulares em meio líquido), tecidos e órgãos para fins práticos, a obtenção de plantas haplóides a partir da cultura de anteras, a produção de metabólitos secundários em biorreatores, a geração de variantes somacionais, a microenxertia, a tecnologia dos protoplastos (células nuas com

capacidade de se fundir) etc. Além disto, não seria demais mencionar ainda que um dos esteios básicos da chamada biologia molecular de plantas (“engenharia genética”) depende em grande extensão de estratégias e técnicas utilizadas em biologia celular.

## PERSPECTIVA E DESAFIOS PARA O FUTURO

Segundo TEIXEIRA (1983), ao realizar uma atualização da biotecnologia aplicada a propagação vegetativa em espécies florestais, verificou que desde que a metodologia apontou para possibilidades futuras, como em Haberlandt, no início dos anos 20, especialmente no que diz respeito a cultura de tecidos, já haviam respostas animadoras, apesar de insipientes. Pelos indícios, o autor previa que até o final daquela década, a técnica estaria consolidada no setor produtivo, e para isso era imperioso que as empresas reforestadoras apoiassem as pesquisas, incentivassem a qualificação técnica do seu pessoal, instalassem laboratórios próprios, além de se prepararem para a nova “revolução verde”, prometida pelo rápido crescimento de ciência na área de biotecnologia.

O avanço de modernas tecnologias e suas conseqüências eram motivos de preocupações, uma vez que o uso inadequado de tais tecnologias poderia resultar em catástrofe, especialmente para florestas tropicais, que teriam de absorver os avanços científicos, sem conhecimento suficiente de suas florestas, evidenciando as questões científicas, econômicas, éticas e ecológicas, para um futuro próximo.

Por sua vez, THOMPSON (1992) predizia que, no futuro, a propagação vegetativa ou clonagem por estaquia de materiais desejados estava calcada nos fatores:

a) **Facilitação da propagação** através de construções e equipamentos adequados aos trabalhos de propagação em grande escala;

b) **Meio de enraizamento** deve ser aperfeiçoado, com o uso maciço por exemplo de espuma ou vermiculita, que protejam o sistema radicular durante o transplante;

c) **Efeitos de microorganismos** devem ser estudados com maior atenção uma vez que alguns organismos inferiores são muito úteis no enraizamento de estacas, como no caso do *Agrobacterium rhizogenes*, que promove enrai-

zamento em *Populus* e em *Corylus*, ou ainda, a ação das endo e ectomicorrizas que promovem aumento de raízes em várias espécies florestais;

**d) Custos de produção da clonagem** devem ser drasticamente reduzidos para que seja competitivo com as mudas tradicionais. O controle automático de interior das casas de vegetação é uma necessidade, apesar do seu custo inicial. A racionalização das etapas e o bom gerenciamento são fundamentais para a redução de custos.

Em se tratado de estratégia e desafio para o futuro, MESÉN et al. (1992) considerava que, além das preocupações normais da clonagem por enraizamento de estacas, como por exemplo, a qualidade do sistema radicular desenvolvido e os riscos naturais de ataque de pragas e de doenças o maior desafio era desenvolver uma técnica de baixo custo e levar essa técnica aos pequenos plantadores de florestas, muito comuns nas Américas Central e do Sul. Este problema, em parte, foi resolvido com o desenvolvimento do sistema de sub-nebulização que prima pela simplicidade, desde que as espécies tenham aptidão natural para o enraizamento.

HAINES (1994) por sua vez, considera que a estratégia para compatibilizar a biotecnologia (aqui inserindo-se a clonagem) com o melhoramento é a racionalização de recursos na seguinte ordem:

**a) investigação a longo prazo:** engenharia genética para se determinar a esterilidade do material, no que se basearão muitas das aplicações finais; utilização de marcadores moleculares e técnicas de transformação de DNA para investigar processos genéticos a nível molecular de aspectos como o crescimento de plantas, a adaptação e a qualidade da madeira; as técnicas como a embriogênese somática, combinada com a tecnologia de sementes artificiais devem ser consideradas prioritárias;

**b) investigações específicas a longo prazo:** engenharia genética para características úteis, incluindo-se a redução de lignina nas espécies destinadas ao papel e a celulose, tolerância ao frio, especialmente nos eucaliptos, resistência aos insetos como nas meliaceas, com variedades transgênicas, seleção de espécies com ajuda de marcadores moleculares;

**c) investigação a curto e a médio prazo:** estudo de correlações genéticas entre a capacidade

regenerativa e as características de valor econômico, desenvolvimento de método de crioconservação como meio de manter a fase juvenil, em programas avançados de reprodução de espécies industriais, desenvolver a crioconservação para espécies de difícil conservação por sementes, implementar técnicas de micropropagação para outras espécies menos estudadas.

Desta forma, os maiores desafios da clonagem para o futuro a médio e a longo prazo, provavelmente continuam sendo as questões levantadas por LANDIS et al. (1992), que continuam atuais, além naturalmente, do auto-limite impostos aos pesquisadores por questões éticas, que não podem ser descartadas; além da questão da transferência de tecnologia mais apurada e já desenvolvidas, a custos razoáveis, que são cruciais e que, por si, já são um desafio.

## MICROPROPAGAÇÃO NA CULTURA DO ANTÚRIO

Segundo Tombolato (2002), a produção de grandes quantidades de plantas só é possível pela cultura in vitro, uma vez que, pelo método tradicional de propagação apenas algumas unidades de novas mudas podem ser obtidas anualmente. Tecidos somáticos, representados por secções de folhas jovens, submetidos à inoculação de meios de cultura adequados, com definido balanço hormonal, têm possibilitado a obtenção de novas plantas.

São utilizados como material vegetal folhas bem jovens. Passam por um processo de esterilização seguindo os seguintes passos (Tombolato, 2004):

- lavagem das folhas em água corrente com detergente e esponja bem macia;
- colocar em recipiente adequado e lavar com álcool 70% por 5 segundos. Escorrer;
- adicionar solução de hipoclorito de cálcio a 1,5% + 3-4 gotas de Tween 20e, sob agitação, permanecer por 10 minutos. Escorrer;
- realizar três lavagens sucessivas com água destilada esterilizada.

### Inoculação (Tombolato, 2002)

- após a esterilização superficial, colocar as secções foliares sobre papel de filtro estéril e cortar em segmentos de 1 cm<sup>2</sup>, com o auxílio de

pinça e bisturi esterilizados;

- submeter à inoculação em meio de cultura P1, com 1,3 do explante submerso ao meio.

- colocar os frascos contendo explante em câmara escura, a 25°C, para a indução à formação de calo;

- após 2 a 3 meses, transferir os frascos para câmara clara com 16 horas de fotoperíodo;

- quando os calos apresentarem início de formação de clorofila, após 10 a 15 dias, transferir para o meio de cultura P2;

- passados 2 meses, quando as plântulas atingirem aproximadamente 1 cm de altura, transferir para o meio P3 onde permanecerão por mais 2 a 3 meses. Nestas condições, algumas plântulas podem dar início à formação de raízes;

- posteriormente transferir as plântulas mais desenvolvidas para o meio MS, enquanto as plântulas menores permanecem no meio P3;

- após 2 a 3 meses aclimatar as mudas.

#### **Aclimatização (Tombolato, 2002)**

- retirar as plântulas bem desenvolvidas e com raízes do meio de cultura, lavá-las em água corrente e planta-las em bandejas plásticas ou de isopor, contendo como substrato fibra de coco curtida umedecida com solução nutritiva, cobertas com plástico transparente e mantidas em câmara de cultivo, com 1.500 lux, e fotoperíodo de 16 horas de luz a 25°C.

- após 30-40 dias, transferir as caixas para temperatura ambiente e remover a cobertura gradualmente para a perfeita adaptação das mudas;

- decorridos mais 15 dias, transferir as plantas individualmente para recipientes contendo como substrato terra argilosa + areia + matéria orgânica na proporção de 1:1:1 e manter em casa de vegetação com 70% de sombreamento.

Manter as mudas obtidas in vitro por cerca de 8 a 10 meses encanteiradas em espaçamento reduzido de cerca de 15 x 15cm a 20 x 20cm. Após esse período, transplantar em novos canteiros no espaçamento definitivo. As mudas não devem ser deixadas em alta densidade além do tempo necessário, o que acarretaria competição entre elas e como consequência, o desenvolvimento desuniforme.

#### **Condições para a aclimação (Tombolato, 2002)**

*Rev. Bras. Hort. Orn. Campinas, v.10, n.1/2, p.15-19, 2004*

a) As plântulas devem apresentar aspecto sadio com sistema radicular e parte aérea proporcionais, a fim de garantirem maior taxa de sobrevivência;

b) as plântulas in vitro requerem baixa luminosidade e quando submetidas ao aumento de luz sofrem o processo de destruição das moléculas de clorofila, tornando-se cloróticas e queimadas. Para evitar esses problemas, as plântulas podem ser removidas, gradualmente, para um intensidade de luz sob a qual terá seu crescimento.

c) A temperatura do ar em que as plântulas são mantidas, durante a fase de aclimação, devem estar na faixa entre 13 a 30°C e determinada, primeiramente, pela espécie da planta em questão.

d) Para a adubação, adicionar periodicamente macro e microelementos no substrato onde as plântulas foram transplantadas.

e) para o controle fitossanitário são necessários cuidados especiais. Normalmente, antes do transplante, as plântulas são lavadas, de referência com água morna para a 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 semanas depois do transplante, pois podem ser fitotóxicos nessa fase. Outros métodos aplicados para garantir sanidade incluem o uso de desinfetantes no meio de cultura, nos recipientes e bancadas ou mesmo coberturas novas de polietileno ou tratadas para o controle de patógenos. Mãos limpas e instrumentos limpos e desinfetados também são imprescindíveis.

#### **BIBLIOGRAFIAS CONSULTADAS**

BREWBAKER, J.L. Genética na Agricultura. Tradução de J.T. do A. Gurgel e R.Venkovsky. São Paulo, SP. Ed. Polígono e Ed. Universidade de São Paulo, 1969.

BRUNE, A. Estratégia de melhoramento genético de árvores para energia. In: Anais Simpósio IUFRO "Florestas Plantadas nos Neotrópicos como Fonte de Energia", Viçosa, 6 - 13 fevereiro. Viçosa: 52 - 61. 1983.

FERREIRA, M. Melhoramento e a silvicultura intensiva clonal. Piracicaba: IPEF, v. 45, p. 22 - 30, 1992.

GUERRA, M.; KEMPER, E. L. Tecnologias futuras: aplicação da poliembriogênese para a propagação massal de plantas elite de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. Ver. Inst. Flor. São Paulo. v. 4, p. 1233 - 1236, 1992

REZENDE, G.D.S.P.; BERTOLUCCI, F. de L. G.; RAMALHO, M. A.P. Eficiência da seleção precoce na recomendação de clones de eucalptos avaliado no Norte do Espírito Santo e Sul da Bahia. Cerne, Lavras, v. 1, p. 45 - 50, 1994.

ROSSE, L.N.; DAVIDE, A.C. BERTOLUCCI,

F.de L.G.; RAMALHO, M.P. Influência da idade e da época de abate na brotação das cepas e no enraizamento de estacas em clones de *Eucalyptus* sp. Cerne, Lavras, v. 3, N.1, p. 117 - 128, 1997.

TEIXEIRA, S.L. Técnicas de culturas de tecidos aplicáveis às espécies florestais. In: Anais Simpósio IUFRO "Florestas Plantadas nos Neotrópicos como Fonte de Energia", Viçosa, 6 - 13 fevereiro. Viçosa: 69 - 78, 1983.

TOMBOLATO, A.F.C.; RIVAS, E.B.; CONTINHO, L.N.; BERGMANN, E.C.; IMENES, S.L.; FURLANI, P.R.; CASTRO, C.E.F.; MATTHES, L.A.F.; SAES, L.A.; COSTA, M.M.; TAGLIACOZZO, G.M.D.; LEME, J.M. Cultivo