

# MICROPROPAGAÇÃO

---

## O CULTIVO *IN VITRO* NO LABORATÓRIO DE ENSINO

MARIA ANTONIA MALAJOVICH (Doutora em Ciências Biológicas, Genética, UFRJ)  
Coordenadora de Biotecnologia do Instituto de Tecnologia ORT.

VITOR SOARES MANN (Mestre em Educação, UNIRIO)  
Chefe dos laboratórios de Ciências e de Biotecnologia do Instituto de Tecnologia ORT.

## ORGANIZAÇÃO DO TEXTO

### FUNDAMENTOS BIOLÓGICOS

#### POR QUÉ ENSINAR AS TÉCNICAS DE MICROPROPAGAÇÃO?

#### NO LABORATÓRIO DE ENSINO

##### OS EXPERIMENTOS

Cultura *in vitro* de plantas inteiras

Cultura *in vitro* de órgãos isolados

Cultura *in vitro* de calo

Cultura *in vitro* de células isoladas

##### OS PROCEDIMENTOS

#### OS OBJETIVOS POSSÍVEIS

##### PRIMEIRO OBJETIVO: ESTABELECEER UMA CULTURA ASSÉPTICA

A obtenção dos explantes

Desinfecção da superfície do explante

Semeadura e incubação

##### SEGUNDO OBJETIVO: REGENERAR UMA PLANTA

Multiplicação

Preparação das plântulas para a transferência ao solo

Aclimação

#### VALE A PENA?

#### BIBLIOGRAFIA BÁSICA

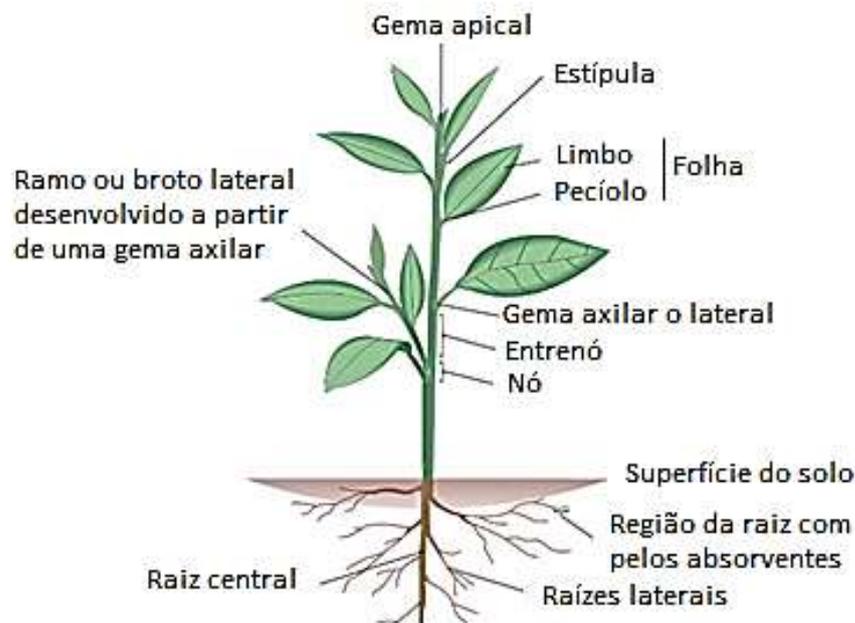
## FUNDAMENTOS BIOLÓGICOS

A reprodução assexual é utilizada para obter um grande número de mudas a partir de uma única planta. Dependendo do caso, aproveitam-se bulbos (cebola), cormos (gladíolo), rizomas (samambaias), tubérculos (batata-inglesa), caules (banana), raízes (batata-doce, maçã, amora), folhas (begônia, espada-de-são-jorge), estacas (videiras) etc. As plantas obtidas por propagação assexuada ou vegetativa são idênticas à planta-mãe e idênticas entre si. Em outras palavras, são clones.

Denomina-se totipotência a capacidade de uma célula regenerar réplicas do organismo do qual ela deriva. Restringida em animais, esta propriedade característica das plantas permite a sobrevivência em condições ambientais desfavoráveis ou após o ataque de herbívoros, pragas e patógenos.

A cultura *in vitro* ou micropropagação se inicia com a extração de pequenos fragmentos de tecido retirados de diversas partes da planta, tais como folhas, raízes, segmentos nodais e gemas axilares, gemas florais e apicais (Figura 1). Uma vez limpos e desinfetados, os explantes são transferidos em condições assépticas a um meio de cultura adequado. Subculturas periódicas desses explantes permitem a amplificação do material e, mais tarde, sua diferenciação de modo a regenerar a planta inteira.

Figura 1. As diversas partes de uma planta angiosperma.



### **POR QUE ENSINAR AS TÉCNICAS DE MICROPROPAGAÇÃO?**

A cultura *in vitro* pode ser desenvolvida inicialmente em espaço reduzido e independentemente de fatores climáticos e épocas do ano. Calcula-se que 10 m<sup>2</sup> de prateleiras são suficientes para o cultivo de 20.000 plantinhas.

O número de indivíduos produzido por cultura *in vitro* é muito maior do que o número de indivíduos que poderia ser obtido pelo método de multiplicação tradicional. O cultivo de uma gema de eucalipto pode originar em um ano 75 trilhões de mudas em vez das 100 ou 200 que são obtidas habitualmente por estaquia. Estes resultados são de grande interesse para as indústrias de papel, celulose e madeiras.

A cultura *in vitro* possibilita a produção e distribuição de mudas livres de patógenos a partir de tecidos meristemáticos, que não são infectados por vírus. Um exemplo é a produção de tubérculos de batata livres de vírus para inclusão em programas de certificação de batata-semente.

Também permite a produção de sementes sintéticas, que consistem em um embrióide formado a partir de uma massa de tecidos obtida *in vitro*, envolvido em uma substância gelatinosa com nutrientes e coberto por um plástico biodegradável. O conjunto constitui uma semente artificial que se desenvolve normalmente quando semeada na terra. Lançadas desde aviões, estas sementes facilitam o reflorestamento em regiões degradadas de difícil acesso.

As técnicas de cultura *in vitro* de vegetais foram rapidamente assimiladas por empresas e instituições de pesquisa e desenvolvimento, porque facilitam o melhoramento genético das variedades comerciais e, também, porque representam uma etapa indispensável na obtenção de uma planta transgênica.

Sendo técnicas de domínio público, relativamente simples e de baixo custo, numerosas empresas as utilizam, no mundo todo, para garantir a qualidade genética e fitossanitária das mudas e sementes comercializadas. Esta tecnologia está amplamente difundida na América Latina, onde representa o segundo produto mais comercializado da biotecnologia agrícola, com ampla difusão na olericultura, na hortifruticultura, na floricultura e na propagação de plantas ornamentais, assim como na produção de plantas de interesse industrial (cana, café) e de mudas de essências florestais para as indústrias de papel.

### **NO LABORATÓRIO DE ENSINO**

Os complexos protocolos de pesquisa em micropropagação vegetal exigem reagentes ou condições de trabalho inabituais no laboratório de ensino, mas isso não significa que seja impossível desenvolver algumas atividades.

Quais os requerimentos mínimos? Um canto de laboratório limpo, uma panela de pressão, numerosos frascos de maionese ou de marmelada com suas respectivas tampas, alguns reagentes para a preparação dos meios, um estereomicroscópio ou lupa binocular, e um lugar com iluminação indireta para a incubação dos cultivos.

Um aparelho de fluxo laminar é bem-vindo, mas também pode-se trabalhar dentro de uma caixa plástica (50cm x 40cm x 40 cm) previamente desinfetada. Com esses materiais e sabendo manter a assepsia, é possível dar início a vários experimentos simples de cultivo de tecidos vegetais (Figura 1).

Diferente das técnicas de propagação vegetativa, as técnicas de cultura de tecidos vegetais representam, no laboratório de ensino, um desafio considerável para o Professor: baixa repetitividade, vasto trabalho de preparação e numerosas contaminações. A lentidão no crescimento dos explantes pode ser decepcionante para quem esteja acostumado a lidar com resultados imediatos. Contudo, são essas dificuldades que as tornam mais interessantes.

Com algum empenho, os experimentos podem ser desenvolvidos com êxito. Graças a um movimento do tipo DIY (*Do-it yourself*) conduzido por pessoas amantes das plantas e da jardinagem, hoje encontramos na WWW protocolos simples e vídeos entusiastas mostrando como proceder para o cultivo *in vitro* caseiro de algumas plantas (*Kitchen experiments*).

Figura 1: O trabalho no laboratório de ensino, na bancada (à esquerda) e no fluxo laminar (à direita).



## OS EXPERIMENTOS

### Cultura *in vitro* de plantas inteiras

As sementes germinam e se desenvolvem no meio de cultivo até o momento da transferência a terra. Esta técnica é aplicada comercialmente para a produção de orquídeas, mas no laboratório de ensino convém começar com sementes maiores e que germinem mais rápido.

Tivemos bastante sucesso com o cultivo *in vitro* de embriões de milho. Nesta modalidade trata-se de separar os embriões do resto da semente e transferi-los ao meio de cultivo.

### Cultura *in vitro* de órgãos isolados

O explante pode ser extraído de um tecido (meristemas) ou de um órgão (gemas ou brotos, raízes, anteras etc.). A capacidade de regeneração diminui com a idade da planta e também depende do genótipo e das condições ambientais. Maior nas plantas herbáceas que nas lenhosas, essa capacidade está distribuída em forma desigual entre algumas famílias de Solanáceas, Crucíferas, Gesneriáceas, Compostas e Liliáceas.

Na literatura correspondente, a violeta africana (*Saintpaulia*) figura como planta modelo, por ser fácil de cultivar por propagação vegetativa e adequada para os estudos morfológicos. Contudo, encontramos que as folhas são muito difíceis de desinfetar e tivemos melhores resultados com as folhas e os embriões foliares de *Kalanchoe daigremontiana* (*Bryophyllum*). Também conseguimos resultados satisfatórios com brotos de batata-inglesa, raízes de ervilha, gemas de repolho e flores de couve-flor e de brócolis.

### Cultura *in vitro* de calo

Um calo é uma massa de células desdiferenciadas que cresce a partir de um explante. Uma vez estabelecido em um meio de cultivo, o calo pode ser subdividido a cada três ou quatro semanas e mantido indefinidamente em meio nutriente de igual composição. Sua transferência a meios de cultivo com diferentes concentrações de hormônios induz a embriogênese e/ou a organogênese. No laboratório de ensino, cenouras e batatas-doces fornecem calos espetaculares.

### Cultura *in vitro* de células isoladas

Os cultivos de células isoladas em meio líquido visam a produção de metabólitos secundários em fermentadores industriais (alcaloides, perfumes, enzimas, hormônios etc.). Até o momento não realizamos nenhum experimento desse tipo, mas já obtivemos protoplastos por digestão enzimática da parede celular.

## OS PROCEDIMENTOS

Um treinamento básico em técnicas microbiológicas evita numerosas decepções.

Antes de iniciar qualquer procedimento é necessário preparar o meio de cultivo (Guia 96: *Micropropagação – Os meios de cultivo*). Além de meios complexos existem meios alternativos de formulação simples e baixo custo (Guia 111: *Micropropagação - meios clássicos* e Guia 112: *Micropropagação- meios alternativos*).

Também é indispensável verificar que todo o material se encontre pronto e esterilizado, incluídos os instrumentos que serão usados (Guia 85: *Micropropagação – A desinfecção dos instrumentos*).

Deve-se desinfetar o lugar de trabalho com álcool 96<sup>o</sup>. Também é recomendável lavar bem as mãos e os antebraços com água e sabão e, finalmente, esfregar

álcool 70°. A menos de ter uma boa prática microbiológica, evitar o flambado no bico de Bunsen (o álcool é inflamável) substituindo-o na desinfecção de instrumentos pela imersão em álcool ou água sanitária.

Antes de iniciar os procedimentos, prender o cabelo além de retirar relógios ou anéis. Uma boa organização do lugar de trabalho é determinante para o sucesso das atividades.

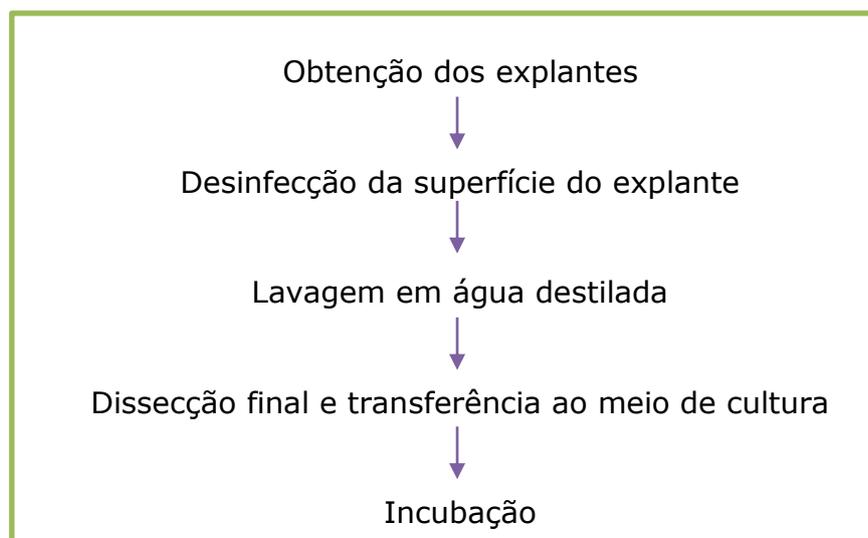
Durante os procedimentos, usar luvas descartáveis nas quais eventualmente se passará álcool e uma máscara cirúrgica e, fundamentalmente, não falar nem passar os braços sobre os explantes ou por cima de frascos abertos contendo meio. Evitar também o abrir e fechar de portas e a circulação de pessoas no laboratório.

Todo o material contaminado será esterilizado e, posteriormente, eliminado.

## OS OBJETIVOS POSSÍVEIS

### PRIMEIRO OBJETIVO: ESTABELECIMENTO DE UMA CULTURA ASSÉPTICA

Os passos necessários para o estabelecimento de uma cultura asséptica são os seguintes:



#### Obtenção dos explantes

Limpar cuidadosamente com água e sabão o material escolhido (folhas, caules, raízes etc.), dando preferência às partes jovens e saudáveis.

#### Desinfecção da superfície do explante

Mergulhar o material retirado da planta-mãe em etanol 70°, durante um a dois minutos, antes de desinfetá-lo com um agente químico como o hipoclorito de sódio (NaClO com 0,5-1% de matéria ativa) em solução, na qual será acrescentada uma gota de detergente.

A concentração da solução de hipoclorito e o tempo necessário para a desinfecção variam com o tipo de explante. A função do detergente é diminuir a tensão superficial, favorecendo o contato entre o explante e o desinfetante. A agitação suave e contínua durante o processo cumpre a mesma função.

O hipoclorito de sódio será eliminado mediante três lavados com água destilada estéril (Guia 90: *Micropropagação – A desinfecção dos explantes*). A seguir, pode ser necessário uma dissecação em condições assépticas para eliminar as partes danificadas dos explantes.

#### Transferência ao meio de cultura

O meio de cultura pode estar distribuído em tubos de ensaio, em placas de Petri ou em frascos de diversos tamanhos. Transferir os explantes em condições assépticas, semelhantes às utilizadas para a cultura de microrganismos.

Devido à composição do meio, nem a umidade nem a disponibilidade de água são fatores limitantes. Para garantir a aeração do cultivo e uma boa oxigenação, substituem-se as tampas dos frascos por filme de PVC.

Figura 2: Substituição das tampas por filme de PVC.



#### Incubação

A uma temperatura entre 23°C e 28°C, na luz durante 12 a 14 horas diárias ou no escuro, dependendo do explante.

## SEGUNDO OBJETIVO: REGENERAR UMA PLANTA

Uma vez dominada a técnica para o estabelecimento de culturas assépticas, os três próximos passos para regenerar uma planta são a multiplicação dos propágulos, a preparação das plântulas para a transferência ao solo e aclimatação.

### Multiplicação

Havendo crescimento e propagação, dividir o material é transferi-lo a um meio fresco, de modo a obter numerosas subculturas. Em alguns casos, basta alterar a composição do meio para estimular a diferenciação. Sempre em condições assépticas.

### Preparação das plântulas para a transferência ao solo

Em condições assépticas, transferir as plântulas das subculturas para um meio de enraizamento onde, além de desenvolver raízes, enrijecerão e começarão a fotossintetizar. Em alguns casos se elimina o açúcar do meio.

### Aclimatação

Quando o desenvolvimento da planta justifica seu traspasso a terra, eliminam-se por lavado o ágar e os vestígios de açúcar. Transfere-se a planta primeiro para o solo ou para algum outro substrato, mais tarde para uma casa de vegetação. Protegidas da iluminação solar direta, elas aumentarão sua capacidade fotossintética adaptando-se lentamente as condições ambientais.

## **VALE A PENA?**

Com certeza.

**BIBLIOGRAFIA BÁSICA**

DODDS J.H E ROBERTS L.W. Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge, Cambridge University Press, 1995.

FAO – FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION / IAEA -INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY –Low cost options for tissue culture technology in developing countries, 2004. 68653-142828-1-PB.pdf

HOME TISSUE CULTURE GROUP. <http://www.hometissueculture.org>

KYTE L. E KLEYN J. Plants from test tubes – 3<sup>th</sup> edition. Portland, Timber Press Inc., 2009.

MANTELL S.H., MATTHEWS J.A. E MCKEE R.A. Princípios de biotecnologia em plantas. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética, 1994.

PIERIK R.L.M. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Madrid, Ediciones Mundi-Prensa, 1990.

RAVEN, et al. Biologia Vegetal. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 2001.

SMITH R.A. Plant Tissue Culture Studies. Reston, National Association of Biology Teachers, 1997.

TORRES A.C. ET AL. Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. Vol.1. Brasília, EMBRAPA-CNPq, 1998.

**AGRADECIMENTOS**

Aos técnicos que ao longo de vinte anos colaboraram na preparação e montagem dos experimentos de micropropagação.

Aos professores e alunos.