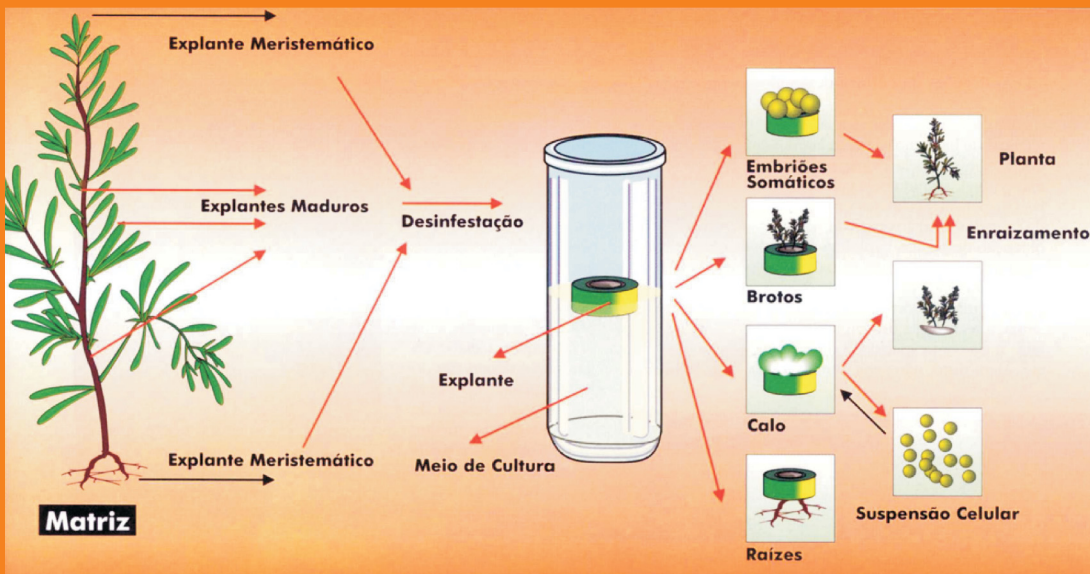


Princípios da Cultura de Tecidos Vegetais





*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Cerrados
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

ISSN 1517-5111

Dezembro, 2002

Documentos 58

Princípios da Cultura de Tecidos Vegetais

Solange Rocha Monteiro de Andrade

Planaltina, DF
2002

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Cerrados

BR 020, Km 18, Rod. Brasília/Fortaleza

Caixa Postal 08223

CEP 73301-970 Planaltina - DF

Fone: (61) 388-9898

Fax: (61) 388-9879

http\www.cpac.embrapa.br

sac@cpac.embrapa.br

Supervisão editorial: *Nilda Maria da Cunha Sette*

Revisão de texto: *Maria Helena Gonçalves Teixeira /*

Jaime Arbués Carneiro

Normalização bibliográfica: *Shirley da Luz Soares*

Capa: *Chaile Cherne Soares Evangelista*

Editoração eletrônica: *Leila Sandra Gomes Alencar*

Impressão e acabamento: *Divino Batista de Souza /*

Jaime Arbués Carneiro

1ª edição

1ª impressão (2002): tiragem 100 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Cerrados.

A553p Andrade, Solange Rocha Monteiro de.

Princípios da cultura de tecidos vegetais / Solange Rocha Monteiro de
Andrade. — Planaltina : Embrapa Cerrados, 2002.

16 p.— (Documentos / Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111; 58)

1. Cultura vegetal - Tecido vegetal. I. Título.
II. Série.

571.538 - CDD 21

© Embrapa 2002

Autora

Solange Rocha Monteiro de Andrade
Biól., Ph.D., Embrapa Cerrados,
solange@cpac.embrapa.br

Apresentação

A cultura de tecidos vegetais é uma ferramenta com alto potencial para aplicação no melhoramento vegetal. Ela pode ser utilizada desde a multiplicação de material genético, para a troca e a avaliação de germoplasma, até a produção de mudas livres de vírus. Sua aplicação também se estende ao aumento da variabilidade genética mediante a produção de variantes somaclonais e como fase essencial para a obtenção de plantas transgênicas. No entanto, poucas são as publicações, em português, sobre cultura de tecidos vegetais. A Embrapa, com a publicação dos livros *Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas*, em 1990 e *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*, em 1998, tem contribuído para preencher essa lacuna. No entanto, ainda existe a necessidade de bibliografia de caráter mais básico sobre esse assunto, visando a atingir um público leigo, mas curioso sobre o assunto.

Nesse sentido é que a Embrapa Cerrados apresenta essa publicação com conceitos básicos da cultura de tecidos, explicando cada conceito de forma clara e concisa, além de descrever cada etapa do processo e as aplicações dessa ferramenta biotecnológica.

Carlos Magno Campos da Rocha
Chefe-geral da Embrapa Cerrados

Sumário

Aspectos Gerais	9
Fatores que Afetam a Regeneração <i>in vitro</i>	10
Etapas e Vias de Regeneração <i>in vitro</i>	12
Principais Aplicações da Cultura de Tecidos	14
Conclusão	15
Referências Bibliográficas	15
Abstract	16

Princípios da Cultura de Tecidos Vegetais

Solange Rocha Monteiro de Andrade

Aspectos Gerais

A cultura de tecidos vegetais é uma técnica com grande aplicação na agricultura. Nessa técnica, pequenos fragmentos de tecido vivo, chamados explantes, são isolados de um organismo vegetal, desinfestados e cultivados assepticamente, por períodos indefinidos em um meio de cultura apropriado. O objetivo é obter nova planta idêntica à original ([Figura 1](#)), ou seja, realizar uma clonagem vegetal que é definida como uma propagação assexuada de células ou organismos de modo a obter novo indivíduo, mantendo-se o genótipo idêntico àquele do ancestral comum ([Torres et al., 2000](#)). Na [Figura 1](#), ilustra-se o princípio geral da cultura de tecidos vegetais visando à reprodução de determinada matriz.

A cultura de tecidos vegetais é feita de um explante ([Figura 1](#)) que é todo segmento de tecido ou órgão vegetal utilizado para iniciar uma cultura *in vitro*. Pode ser um fragmento de folha, de raiz, de caule ou de qualquer tecido que responda às condições de indução do meio de cultura, com vistas à regeneração vegetal *in vitro* ([Torres et al., 2000](#)). Essa regeneração é fundamentada na capacidade de a proliferação das células vegetais organizarem-se em tecidos e, eventualmente, em plantas completas ([Kerbauy, 1997](#); [Mantell et al., 1994](#)). Essa capacidade é denominada totipotência e considera que as células vegetais manifestam, em momentos diferentes e sob estímulo apropriado, a potencialidade de iniciar novo indivíduo multicelular ([Torres et al., 2000](#)). Teoricamente, considera-se que todas as células vegetais são capazes de expressar sua totipotência. No entanto, os explantes são uma mistura de células em variados

estados: fisiológico, bioquímico e de desenvolvimento. Nesse sentido, espera-se que a exposição desses explantes a um ambiente *in vitro* estimule reações diversificadas nos diferentes tipos celulares, fazendo com que somente algumas células desse explante respondam às condições de cultura *in vitro*, levando à regeneração de um novo indivíduo (Mantell et al., 1994). Essa habilidade que uma célula ou um grupo de células tem ao responder a um estímulo indutivo visando a um processo de desenvolvimento é denominada competência (Torres et al., 2000).

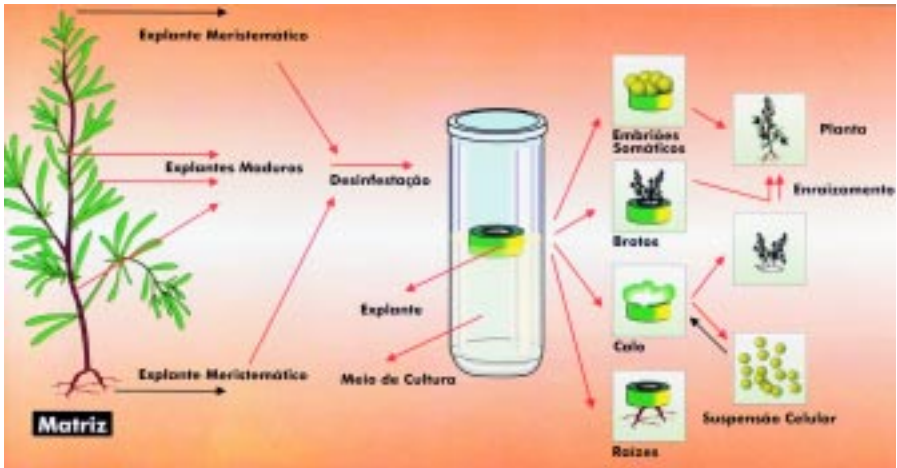


Figura 1. Princípio geral da cultura de tecidos.

Fonte: (Kerbaui, 1997).

Fatores que Afetam a Regeneração *in vitro*

Existem três fatores que afetam a regeneração da planta *in vitro*: o genótipo (qual espécie, cultivar ou variedade que está sendo utilizada), a fonte de explantes (folha, raiz, caule, meristema, etc) e a condição da cultura (meio de cultura, luz, temperatura, vasilhame). O sucesso da iniciação e da regeneração da cultura *in vitro* depende da decisão correta no estabelecimento de todos esses fatores. Na realidade, muito ainda precisa ser conhecido sobre os mecanismos de hormônios vegetais e sobre os processos que controlam o desenvolvimento das plantas. A melhor via para o desenvolvimento de sistemas de regeneração *in vitro* continua sendo aquela baseada em testes que incluem esses três fatores. O objetivo desses testes é obter uma combinação ótima dos fatores para que o processo seja bem-sucedido (Caldas et al., 1998).

A escolha do genótipo a ser utilizado na cultura de tecidos vai depender dos objetivos experimentais. É interessante notar que variedades de uma mesma espécie respondem de maneira diferente às condições de cultivo. No entanto, alguns autores consideram que toda espécie e toda cultivar são capazes de responder às condições de cultura *in vitro* desde que seja utilizada uma combinação correta dos demais fatores que afetam a regeneração *in vitro* ([Mantell et al., 1994](#)).

A fonte de explante ([Figura 1](#)) também é fator importante no sucesso da regeneração *in vitro*, pois a capacidade de regeneração depende da maturidade, do estágio fisiológico e do tecido utilizado. Por exemplo, uma folha em senescência já perdeu grande parte de seus nutrientes e está em processo degenerativo, não sendo uma boa fonte de explante. De modo geral, tecidos jovens e em crescimento são utilizados como fonte de explante.

As condições de cultura, principalmente, o meio de cultura são decisivos para o sucesso da regeneração *in vitro*. O meio de cultura é constituído de sais minerais (micro e macronutrientes), nitrogênio reduzido, uma fonte de carbono, vitaminas e reguladores de crescimento, necessários para manter a divisão celular e a proliferação dos explantes. A combinação adequada entre esses componentes, associada às demais condições da cultura como luz (intensidade, qualidade e fotoperíodo), temperatura e vasilhame da cultura (tamanho e permeabilidade a trocas gasosas) é a base da tecnologia da cultura de tecidos vegetais ([Kerbaui, 1997](#)). Na Figura 2, ilustra-se uma câmara de crescimento em que são controlados e estudados os diferentes fatores que afetam a regeneração *in vitro*.

Foto: Antônio Carlos Torres

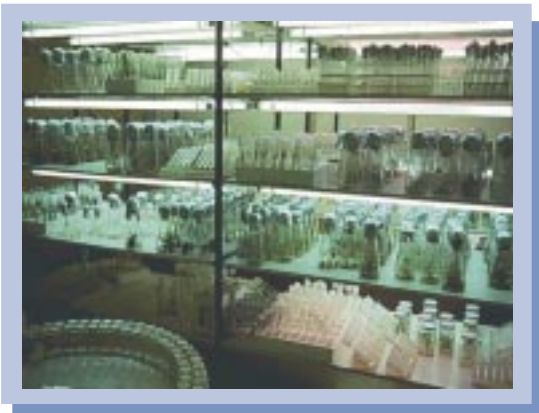


Figura 2. Câmara de crescimento utilizada na tecnologia de cultura de tecidos vegetais.

Etapas e Vias de Regeneração *in vitro*

Os explantes, antes de serem inoculados em um meio de cultura, precisam ser desinfestados ([Figura 1](#)). A desinfestação é um processo de esterilização da superfície do explante visando a eliminar os microrganismos como bactérias, fungos, leveduras. A contaminação dos explantes por microrganismos é um problema da cultura de tecidos, porque além de competirem pelos nutrientes, alguns deles produzem toxinas que influenciam o processo de regeneração do explante. Os explantes são geralmente desinfestados em soluções de hipoclorito de cálcio 2% ou hipoclorito de sódio 0,5 a 1%, durante 5 a 20 minutos, sendo, em seguida lavados cuidadosamente em água destilada autoclavada. A concentração de hipoclorito, o tempo e modo de desinfestação variam com o tipo e a idade do tecido.

Feito o processo de desinfestação, as plantas podem ser regeneradas por organogênese ou embriogênese somática ([Figura 1](#)). Organogênese é uma via de desenvolvimento na qual órgãos vegetais (brotos, raízes) ou ambos são induzidos à diferenciação a partir de uma ou várias células. A organogênese pode ser direta ou indireta. Na direta, também chamada adventícia, o órgão vegetal é induzido e desenvolve diretamente de um explante, isto é, sem passar por uma fase inicial de calo. Na indireta, há uma fase inicial de proliferação e crescimento de calo, seguido por indução de brotos ou raízes e desenvolvimento desses tecidos ([Mantell et al., 1994](#)). Calo é um grupo ou massa de células, com crescimento desordenado que pode apresentar certo grau de diferenciação ([Figura 3](#)) ([Torres et al., 2000](#)).

Figura 3. Calo de amor-perfeito (*Viola tricolor*) contendo embriões em diferentes estádios de desenvolvimento.

Foto: Gilberto Kerbaux



A embriogênese somática é uma via de desenvolvimento na qual a formação de embriões é induzida de células somáticas. Como a organogênese, a embriogênese somática pode ocorrer diretamente de um explante sem o aparecimento de calos. Entretanto, a via de embriogênese indireta ([Figura 3](#)), na qual embriões somáticos são induzidos e desenvolvidos de proliferações de calos é a mais comum. Assim como ocorre na organogênese, certo período de tempo é necessário para desdiferenciar e obter competência para a via embriogênica, iniciada de uma cultura celular ([Mantell et al., 1994](#)).

Outra via de regeneração é a micropropagação, tomando-se como base explantes meristemáticos. Essa via tem a vantagem de as plantas regenerarem-se diretamente de um tecido organizado sem a necessidade do estágio de calo. Desse modo, tem-se uma economia de tempo, bem como elimina-se a variação somaclonal, que é associada a longos períodos de cultura de calos. A variação somaclonal é uma variação genética espontânea de plantas regeneradas de cultura de células ou tecidos *in vitro* a qual é indesejada quando o objetivo é obter uma planta idêntica à planta-matriz ([Mantell et al., 1994](#)).

A regeneração de plantas por organogênese ou embriogênese somática, direta ou indireta, normalmente, requer uma fase ou de macropropagação, ou aclimação, depois que as plântulas são produzidas. Essa fase envolve a exposição das plantas ao ambiente externo que possui umidade relativa mais baixa e variações das condições de luz e temperatura ([Figura 4](#)). Depois do crescimento sustentável, nesse meio ambiente, as plântulas podem ser colocadas em casa de vegetação ([Figura 5](#)) ([Mantell et al., 1994](#)).



Figura 4. Etapas da aclimação.

Foto: Antônio Carlos Torres



Foto: Solange R. M. Andrade

Figura 5. Casa de vegetação.

Principais Aplicações da Cultura de Tecidos

A cultura de tecidos pode ser empregada para a multiplicação de espécies de difícil propagação, como por exemplo, algumas espécies nativas do Cerrado. Outro exemplo de grande importância é a limpeza clonal por meio da qual é possível, em algumas espécies, como abacaxi, citrus, morango, batata e outras, a produção de mudas livre de vírus ([Ferreira et al., 1998](#)). Essa técnica consiste em cultivar meristemas livres de vírus e induzir a formação de material propagativo geneticamente idêntico aos parentais.

A cultura de tecidos também pode ser empregada de diferentes maneiras dentro de um programa de melhoramento vegetal. Embora não estejam diretamente envolvidas no desenvolvimento de cultivares, muitas vezes, essas técnicas oferecem soluções exclusivas nas diferentes fases desse processo. No melhoramento de espécies que apresentam problemas de dormência de sementes, pode-se utilizar a técnica de germinação *in vitro*. Em alguns casos, quando o desenvolvimento do fruto é um processo prolongado, pode-se utilizar a cultura de embriões imaturos, na germinação, para acelerá-la.

A variabilidade genética é a base para um programa de melhoramento e, normalmente, conservada em acessos de bancos de germoplasma *in vivo*. No entanto, em alguns casos, sobretudo, em espécies propagadas vegetativamente,

a manutenção *in vitro* é uma alternativa menos dispendiosa que *in vivo*. A cultura de tecidos também pode aumentar a variabilidade genética pela variação somaclonal ou dando suporte para outras técnicas como a introgressão de genes e a transformação genética. Finalmente, a cultura de tecidos permite a multiplicação do material genético, auxiliando a troca de germoplasma para avaliação em diversos ambientes, como por exemplo, a multiplicação de genótipos para análise em experimentos replicados. (Ferreira et al., 1998).

Conclusão

A cultura de tecidos é uma ferramenta que oferece soluções originais para o programa de melhoramento vegetal, soluções essas que podem resultar na otimização do tempo e na qualidade das cultivares a serem lançadas por esse programa.

Referências Bibliográficas

- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E.; Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa SPI: Embrapa CNPH, 1998. v. 1, p. 87-132.
- FERREIRA, M. A.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. Aplicações da cultura dos tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa SPI: Embrapa CNPH, 1998. v. 1, p. 21-43.
- KERBAUY, G. B. Clonagem de plantas *in vitro*. **Biotechnology Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 1, n. 1, p. 30-33, maio 1997.
- MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; MCKEE, R. A. Técnicas de cultura de tecidos. In: MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; MCKEE, R. A. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. p. 101-181.
- TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. M.; ROMANO, E. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 128 p.

Plant Tissue Culture

Abstract - *Plant tissue cultures is a process through which small fragments of plant tissue (explant) are isolated from a plant organism, disinfected and aseptically cultivated during indefinite periods in a culture medium. A plant regenerated by tissue culture represents a genetic duplication of an organism through asexual reproduction of cells or tissues, in order to obtain a new individual with an identical genotype to that of the common ancestral. Explant is any kind of plant organ or segment used to settle an in vitro culture, e.g., leaf fragments, root, stem, or any tissue that respond to the induction conditions of the medium tissue culture. In vitro plant regeneration is based on the idea that plant cells are capable, in different stages and under appropriate conditions, to give rise or to form a new individual or plant part which is called totipotence. Theoretically, it is accepted that all plant cells are capable to express totipotence. However, the explant is a mixture of cells in different physiological, biochemical and of developmental stages. Thus, it is supposed that the induction of these cells to in vitro medium stimulates diversified responses in the different cell types. The result of this heterogeneity is that only some cells of the explant will be capable to respond to the in vitro culture conditions, leading to the regeneration of a new individual. This ability of a cell or a group of cells to respond to an inductive conditions results in a development process named competence. Three factors affect the in vitro plant regeneration which are: genotype, explant source and medium condition of the culture. Therefore, the development of an in vitro regeneration system is based on tests among these three factors until their combination becomes a success.*

Index terms: Tissue culture, micropropagation, regeneration, in vitro culture.