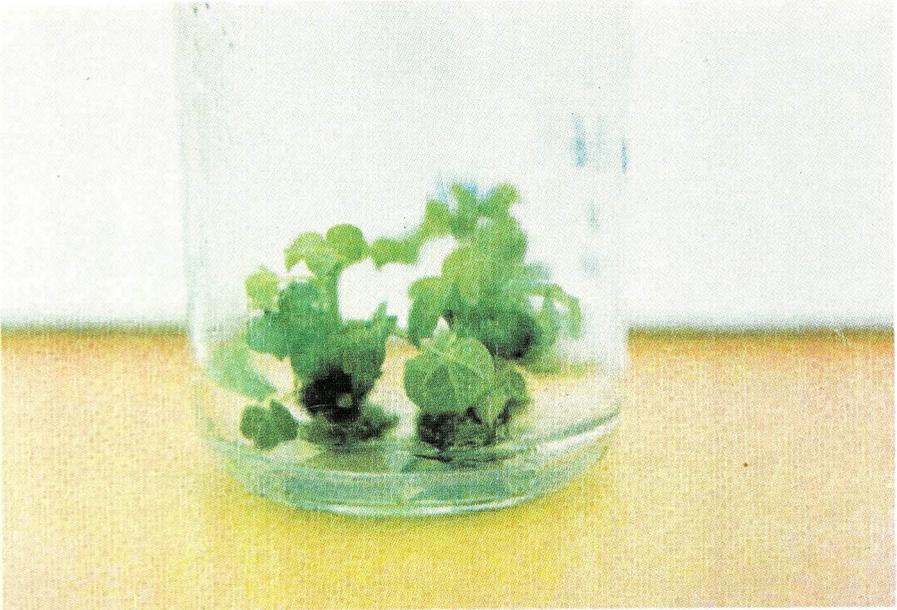


## TÉCNICAS DE MICROPROPAGAÇÃO



ISSN 0103-0205

## TÉCNICAS DE MICROPROPAGAÇÃO

Julita Maria Frota Chagas Carvalho



## **Embrapa Algodão. Documentos, 64**

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Algodão

Rua Osvaldo Cruz, 1143 - Centenário

Caixa Postal 174

Telefone (083) 341-3608

Fax (083) 322-7751

Algodão@cnpa.embrapa.br

<http://www.cnpa.embrapa.br>

CEP 58107-720 - Campina Grande, PB

Tiragem: 300 exemplares

### **Comitê de Publicações**

Presidente: Luiz Paulo de Carvalho

Secretária: Nívia Marta Soares Gomes

Membros: Alderi Emídio de Araújo

Eleusio Curvelo Freire

Francisco de Sousa Ramalho

José da Cunha Medeiros

José Mendes de Araújo

José Wellington dos Santos

Lúcia Helena Avelino Araújo

Malaquias da Silva Amorim Neto

---

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Algodão (Campina Grande, PB)

Técnicas de micropropagação, por Julita Maria Frota Chagas Carvalho. Campina Grande, 1999.

39 p. (Embrapa-CNPA. Documentos, 64)

1. Biotecnologia. 2. Micropropagação-Técnicas. I. Título. II. Série.

CDD 620.8

---

©Embrapa 1999

## SUMÁRIO

	Página
APRESENTAÇÃO.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	7
2. CULTIVO DE TECIDO VEGETAL.....	8
2.1. Uso mais Freqüente do Cultivo de Tecido.....	9
2.2. Fatores que Influem no Êxito do Cultivo de Tecido..	15
3. METODOLOGIA GERAL DA PRÁTICA EM LABORA- TÓRIO.....	19
3.1. Laboratório de Cultivo <i>In Vitro</i> .....	19
3.2. Preparação de Meios de Cultivo.....	25
3.3. Esterilização de Instrumentos e Recipientes.....	29
3.4. Assepsia do Material Vegetal.....	
3.5. Início de um Cultivo, Subcultivo, Enraizamento.....	30
3.6. Transferência de Plantas a Condições <i>Ex Vitro</i> .....	35
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	38

## APRESENTAÇÃO

É reconhecido por todos que a biotecnologia já é o grande paradigma da atual e a base do futuro da agricultura e assim da própria humanidade. Uma das ferramentas da biotecnologia é sem dúvida a micropropagação que envolve a obtenção de embriões, via embriogênese somática que tanto podem ser utilizados a nível comercial, como já é feito com várias culturas, especialmente fruteiras, como os casos da bananeira e do abacaxizeiro; bem como para auxiliar no melhoramento genético de plantas, reduzindo o tempo para a obtenção de cultivares de melhor desempenho global. Com este trabalho, a Embrapa Algodão, via a pesquisadora Julita Maria Frota Chagas Carvalho, coloca a disposição da sociedade, em especial as pessoas ligadas a agricultura, informações sobre técnicas disponíveis de micropropagação.

Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão  
Chefe Geral da Embrapa Algodão

# TÉCNICAS DE MICROPROPAGAÇÃO

Julita Maria Frota Chagas Carvalho<sup>1</sup>

## 1. INTRODUÇÃO

Biotecnologia é o conjunto de técnicas específicas para a modificação e melhoria dos sistemas biológicos, ou seja, plantas, animais, microrganismos, células em cultivo ou produtos derivados, (Pasqual et al., 1997).

Muitos desses processos já têm sido utilizados pela humanidade há milênios, para a produção, por exemplo, de pães, queijos, bebidas fermentadas, como vinhos e cervejas ou, ainda, soros, vacinas, antibióticos etc.

A Biotecnologia moderna inclui metodologias avançadas de genética, biologia molecular e cultura de células e tecidos para seleção, engenharia genética e clonagem de espécies e variedades biológicas, além de processo fermentativo para fins produtivos.

A Biotecnologia permite que seja realizada a introgressão de qualquer gene caracterizado, sem levar em consideração as usuais barreiras biológicas (Altman, 1995). Atualmente, os pesquisadores que utilizam a biotecnologia eliminaram as barreiras biológicas normais, criando plantas transgênicas.

---

<sup>1</sup> Pesquisadora da Embrapa Algodão, CP 174 - CEP 58107-720, Campina Grande, PB

## 2. CULTIVO DE TECIDO VEGETAL

O cultivo de tecido vegetal teve início nos anos 30, mas só logrou maior impulso nos anos 70, com o crescente interesse, tanto na aplicação a nível comercial (micropropagação) como para auxiliar nos programas de Melhoramento genético (Ammirato et al., 1984).

O cultivo de tecidos e células vegetais é uma parte da Biotecnologia que, na atualidade, tem rápida evolução. A velocidade com que tem alcançando novos conhecimentos torna difícil apresentar uma síntese concisa e completa dessas técnicas.

Por cultivo *in vitro* entende-se o conjunto de técnicas e de metodologias que permitem o crescimento e a multiplicação de células, tecidos, órgãos ou partes de órgãos de uma planta (explante) sobre um meio nutritivo e em condições assépticas. Utilizam-se recipientes mais ou menos herméticos e o cultivo se realiza sob condições ambientais de iluminação e temperatura controladas. Esta técnica se baseia principalmente no aproveitamento da totipotência das células vegetais, ou seja, na capacidade de produzir órgãos, como brotos e/ou raízes (organogênese) ou embriões somáticos que regeneram uma planta completa (embriogênese somática) num meio de cultivo favorável.

Diante do exposto, a técnica de cultivo *in vitro* apresenta grande potencialidade, sendo possível a obtenção de novos genótipos, de linhas celulares e de híbridos que, de outra maneira, não poderiam ser obtidos na natureza por causa das barreiras reprodutivas na hibridação sexual.

As técnicas da engenharia genética estão amplamente baseadas no cultivo de tecidos, pois a transformação requer que se possa cultivar, *in vitro*, protoplastos, células e tecidos da planta que se deseja transformar e que, das células e tecidos transformados, se possa regenerar plantas (Gyves, 1994).

Os cultivos de tecidos vegetais podem ser iniciados com qualquer parte da planta: gemas, raízes, folhas, células isoladas, protoplastos (célula sem parede celular) semente, embriões zigóticos, antera etc. A escolha de um ou de outro explante dependerá dos objetivos desejados e da disponibilidade e capacidade de resposta do material vegetal.

Qualquer técnica de cultivo *in vitro* tem como fim primário dirigir o crescimento e o desenvolvimento do explante manipulado em seu redor. Este controle se exerce, basicamente, mediante a adição de substâncias de diversas naturezas, principalmente reguladores de crescimento, ao meio de cultivo, como também variando a concentração de determinados nutrientes e, também, através do controle das condições de iluminação e temperatura.

Uma planta *in vitro* é heterotrófica. Em qualquer caso pode-se dizer que no cultivo *in vitro* necessita-se: água, macro e micronutrientes e açúcar como fonte de carbono (Pierik, 1988).

## 2.1. Uso mais Freqüente do Cultivo de Tecidos

### 2.1.1. Micropropagação

Micropropagação ou propagação vegetativa *in vitro* é utilizada principalmente naquelas plantas de difícil propagação pelos métodos convencionais, permitindo a obtenção de grande número de plantas sadias e geneticamente uniformes, em curto período de tempo. Atualmente, a maior concentração da atividade de micropropagação reside na limpeza clonal e na produção de mudas de espécies ornamentais herbáceas e arbustivas (Bajaj, 1993).

A micropropagação pode ser conduzida através de:

#### 2.1.1.1. Proliferação de Gemas Axilares

Gemas axilares são estimuladas a crescer, formando tufos de brotos que são divididos, dando origem a novos explantes.

#### 2.1.1.2. Indução de Gemas Adventícias por Organogênese Direta ou Indireta

Formação de gemas em locais não convencionais, tanto diretamente de tecidos com potencial morfogenético, quanto indiretamente, através da formação de calos. Entende-se por calo, um aglomerado de células desorganizadas, formadas por células diferenciadas e não diferenciadas, que se dividem de forma ativa e que geralmente se originam em zonas com injúrias químicas ou físicas (Bajaj, 1989).

#### 2.1.1.3. Embriogênese Somática

Consiste na formação de embriões somáticos (embrióides) a partir de tecidos somáticos, com constituição idêntica a da planta-mãe, a não ser nos casos em que ocorre a embriogênese por via indireta, passando pela formação de calos, quando poderá ocorrer variabilidade genética. Para que ocorra embriogênese somática as células diferenciadas devem ser primeiro desdiferenciadas, (desprogramação gênica) para ser determinada como células embriogênicas depois da divisão celular, (Pasqual et al., 1997). A indução de embriogênese é muito difícil se não impossível no caso de muitas espécies vegetais.

Os embrióides podem ser utilizados tanto na continuação da propagação *in vitro* quanto na produção de sementes sintéticas.

### 2.1.1.3.1. Embriogênese Direta

Os embrióides são originados diretamente do explante. A ocorrência de embriogênese direta tem sido registrada em tecidos gametófitos, esporofíticos e em tecidos que se originaram em função da fertilização dos gametas. Este fenômeno ocorre com maior probabilidade em micróporos dentro da antera e tecidos de partes do ovário, incluindo as paredes do ovário ou carpelos, óvulo, embrião zigótico ou plântulas jovens (Bajaj, 1992a)

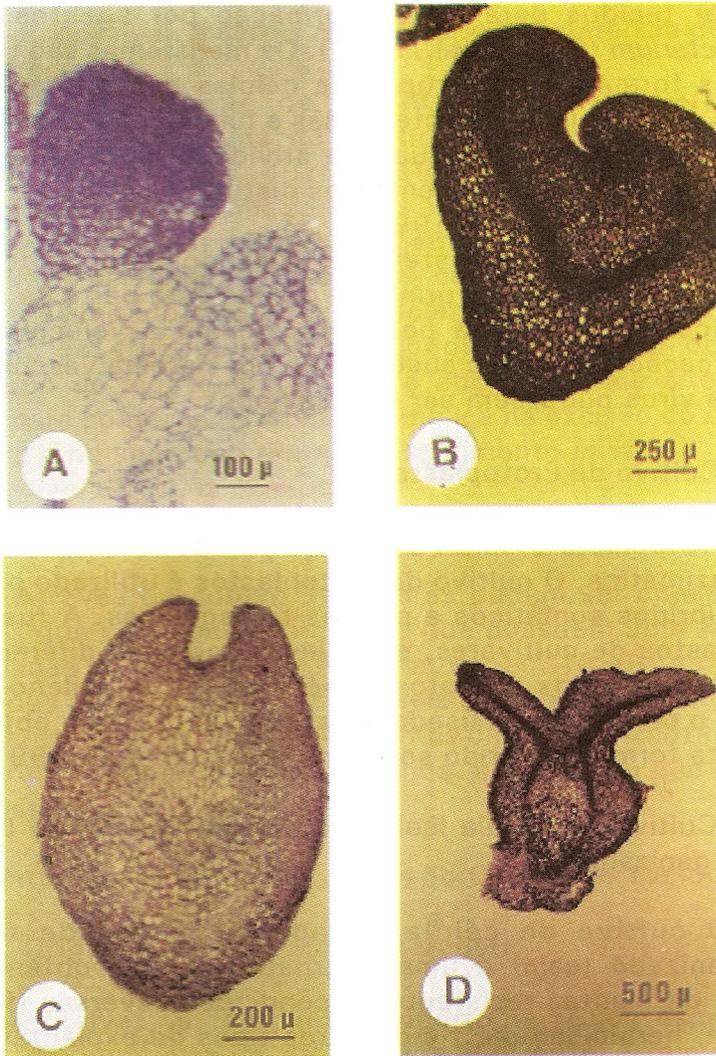
### 2.1.1.3.2. Embriogênese Indireta

Os embrióides são produzidos a partir de calo. A verdadeira embriogênese indireta requer que as células diferenciadas de um explante sejam induzidas a dividir calos não diferenciados e, então, algumas células se tornam comprometidas ou pré-determinadas em uma rota embriogênica (Bajaj, 1992b).

Os embriões somáticos podem ser distinguidos de brotos adventícios por serem bipolares, possuindo primórdios radiculares e foliares, eixo e cotilédones e não têm conexão vascular com o tecido paterno. Por outro lado, gemas axilares ou adventícias podem induzir à formação de condutos procambiais no tecido materno. Esses condutos na planta intacta estabelecem uma conexão entre broto novo e o sistema vascular da planta-mãe. Diferentes dos meristemas, que originam brotos e raízes separadamente, esses embriões quase sempre se originam superficialmente sobre calos e se desprendem facilmente. Os embrióides são formados a partir de células caracteristicamente meristemáticas e, portanto, diferentes das usuais células vacuoladas parenquimatosas encontradas

em calos e em culturas em suspensão; elas possuem citoplasma denso, núcleo grande e muitos grãos de amido (Bajaj, 1991).

As formas dos embriões somáticos correspondentes às distintas fases de desenvolvimento são: pró-embrióide, coração, torpedo e cotiledonar (Figura 1).



**Figura 1.** Formas dos embriões somáticos nas diferentes fases de desenvolvimento (a- pró-embrião b- coração; c- torpedo; d- cotiledonar).

### 2.1.2. Cultivo de Meristemas

Nos últimos anos, o cultivo de meristema, em algumas culturas, tem ganhado certa importância, por ser utilizado para se obter tecidos para a transformação por agentes como *Agrobacterium* (Gould et al., 1991). Os meristemas são tecidos vegetais formados por grupos de células não diferenciadas (células com algumas características e função não específicas) que se caracterizam por sua alta atividade de divisão e são responsáveis pelo crescimento dos distintos órgãos da planta (Deberge & Zimmerman, 1991).

O cultivo de meristema é utilizado para limpeza de viroses, baseando-se no princípio de que esta parte da planta é a única não infectada por vírus, devido a velocidade de multiplicação celular e à ausência de um sistema vascular por onde os vírus pudessem ser disseminados.

### 2.1.3. Cultivo de Protoplastos

Protoplasto é uma célula cuja parede foi removida por ação enzimática. O cultivo de protoplastos é utilizado para se obter híbridos somáticos e plantas transgênicas. A fusão de protoplastos de cultivares, espécies ou gêneros diferentes é induzida por vários produtos e métodos. O polietileno-glicol (PEG) é o produto mais usado para indução da fusão obtendo-se, desta forma, o híbrido somático (Pasqual et al., 1997).

### 2.1.4. Cultivo de Célula Isolada ou Massa de Tecido Desorganizado

O cultivo de célula isolada ou massa de tecido desorganizado (calo) é uma alternativa para a obtenção e seleção de plantas resistentes a condições adversas (fungo, bactéria, herbicidas etc.) e distintos tipos de explantes para produzir compostos de interesse (Ammirato et al., 1984)

### 2.1.5. Cultivo de Embriões Zigóticos ou Embriões Imaturos

O cultivo de embriões zigóticos ou embriões imaturos é usado para obtenção de híbridos entre diferentes espécies, tornando possível, a certas cultivares, a transferência de genes desejáveis.

Para obtenção de híbridos interespecíficos ou intergenéricos através do melhoramento convencional é necessário ser conduzido sucessivas gerações de retrocruzamento com parental receptor, no sentido de introgredir a característica selvagem no parental recorrente e recuperar a performance da espécie comercial; entretanto, este método é limitado em certas espécies, por barreiras de origem biótica: os cruzamentos são incompatíveis ou ocorre a formação do zigoto, porém ele é abortivo. Uma alternativa usada para contornar o problema implica na excisão do embrião imaturo e no seu posterior desenvolvimento *in vitro*.

### 2.1.6. Cultivo de Anteras

Através do cultivo de anteras podem ser conseguidas plantas que são clones de células que possuem uma só cópia da dotação cromossômica (Ammirato et al., 1990). As plantas haplóides assim obtidas são estéreis e não formam sementes; entretanto, pode-se conseguir plantas diplóides homozigóticas, mediante tratamento com colchicina, um produto que duplica cromossomos de células.

## 2.2. Fatores que Influem no Êxito do Cultivo de Tecido

### 2.2.1. Origem e Tipo do Material Vegetal

É, talvez, o fator mais importante. Cada espécie ou variedade comporta-se de maneira diferente e tem grande influência a idade da planta e suas condições prévias no campo,

