

Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento

**Documentos**

ISSN 0103 - 0205  
Outubro, 2003

**116**

**Noções de Cultivo de  
Tecidos Vegetais**



**Embrapa**

**República Federativa do Brasil**

*Luiz Inácio Lula da Silva*  
Presidente

**Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

*Roberto Rodrigues*  
Ministro

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**

**Conselho de Administração**

*José Amauri Dimázio*  
Presidente

*Clayton Campanhola*  
Vice-Presidente

Dietrich Gerhard Quast  
Alexandre Kalil Pires  
Sérgio Fausto  
*Urbano Campos Ribeiral*  
Membros

**Diretoria Executiva da Embrapa**

*Clayton Campanhola*  
Diretor-Presidente

Gustavo Kauark Chianca  
Herbert Cavalcante de Lima  
*Mariza Marilena Tanajura Luz Barbosa*  
Diretores Executivos

**Embrapa Algodão**

*Robério Ferreira dos Santos*  
Chefe Geral

*Luiz Paulo de Carvalho*  
Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

*Maria Auxiliadora Lemos Barros*  
Chefe Adjunto de Administração

*Ramiro Manoel Pinto Gomes Pereira*  
Chefe Adjunto de Comunicação, Negócio e Apoio



ISSN 0103-0205  
Outubro, 2003

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Centro Nacional de Pesquisa de Algodão

## ***Documentos 116***

### **Noções de Cultivo de Tecidos Vegetais**

Julita Maria Frota Chagas Carvalho  
Márcia Soares Vidal

Campina Grande, PB  
2003

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

**Embrapa Algodão**

Rua Osvaldo Cruz, 1143 – Centenário  
Caixa Postal 174  
CEP 58107-720 - Campina Grande, PB  
Telefone: (83) 315-4300  
Fax: (83) 315-4367  
algodao@cnpa.embrapa.br  
<http://www.cnpa.embrapa.br>

**Comitê de Publicações**

Presidente: *Luiz Paulo de Carvalho*  
Secretária: *Nívia Marta Soares Gomes*  
Membros: *Demóstenes Marcos Pedrosa de Azevedo*  
*José Wellington dos Santos*  
*Lúcia Helena Avelino Araújo*  
*Márcia Barreto de Medeiros Nóbrega*  
*Maria Auxiliadora Lemos Barros*  
*Maria José da Silva e Luz*  
*Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão*  
*Rosa Maria Mendes Freire*  
Supervisor Editorial: *Nívia Marta Soares Gomes*  
Revisão de Texto: *Julita Maria Frota Chagas Carvalho*  
Tratamento das ilustrações: *Geraldo Fernandes de Sousa Filho*  
Fotos da capa: *Raimundo Estrela Sobrinho*  
Editoração Eletrônica: *Geraldo Fernandes de Sousa Filho*

**1ª Edição**

1ª impressão (2003): 1.000 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).

---

EMBRAPA ALGODÃO (Campina Grande, PB).

Noções de Cultivo de Tecidos Vegetais por Julita Maria Frota Chagas Carvalho e Márcia Soares Vidal . Campina Grande, 2003.

39p. (Embrapa Algodão. Documentos, 116).

1. Tecido - Cultura. 2. Biotecnologia. I. Carvalho, J.M.F.C. II. Vidal, M.S. III. Título. IV. Série.

---

CDD 660.6

© Embrapa 2003

## **Autores**

### **Julita Maria Frota Chagas Carvalho**

Dra. Engº Agrº da Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143

Centenário C.P.174

CEP 58107-720 Campina Grande, PB. Tel.: OXX83 315 4300

e-mail: [julita@cnpa.embrapa.br](mailto:julita@cnpa.embrapa.br)

### **Márcia Soares Vidal**

Dra., Bióloga da Embrapa Algodão

e-mail: [mvidal@cnpa.embrapa.br](mailto:mvidal@cnpa.embrapa.br)



## **Apresentação**

A cultura de tecidos vegetais é uma ferramenta de grande utilidade e com múltiplas finalidades na agricultura, podendo-se citar entre elas a propagação de plantas, o melhoramento genético, intercâmbio e conservação de germoplasma, a engenharia genética, entre outras.

Esta publicação descreve os princípios básicos das técnicas de cultivo de tecidos vegetais contribuindo para que os interessados neste segmento da biotecnologia possam conhecer suas principais técnicas.

Luiz Paulo de Carvalho  
Chefe Adjunto de Pesquisa & Desenvolvimento



## Sumário

<b>Noções de Cultivo de Tecidos Vegetais</b> .....	11
<b>1. Introdução</b> .....	11
<b>2. Cultivo de Tecidos Vegetais</b> .....	12
2.1. Aplicação do Cultivo de Tecidos .....	13
2.1.1. Micropropagação.....	14
2.1.1.1. Proliferação de Gemas Axilares .....	15
2.1.1.2. Indução de Gemas Adventícias por Organogênese Direta ou Indireta.....	15
2.1.1.3. Embriogênese Somática .....	16
2.1.1.3.1. Embriogênese Direta.....	16
2.1.1.3.2. Embriogênese Indireta .....	16
2.1.2. Cultivo de Meristemasc .....	19
2.1.3. Cultivo de Protoplastos .....	19
2.1.4. Cultivo de Célula Isolada ou Massa de Tecido Desorganizado .....	20
2.1.5. Cultivo de Embriões Zigóticos ou Embriões Imaturos ....	21
2.1.6. Cultivo de Anteras .....	22
2.2. Fatores que Influem no Exito do Cultivo de Tecidos .....	23
2.2.1. Origem e Tipo do Material Vegetal .....	23
2.2.2. Composição do meio de Cultivo .....	23
2.2.2.1. Reguladores de Crescimento .....	23
2.2.3. Condições de Incubação .....	25
Anexo I .....	26
Anexo II .....	29
<b>3. Referências Bibliográficas</b> .....	37



# **Noções de Cultivo de Tecidos Vegetais**

---

Julita Maria Frota Chagas Carvalho  
Marcia Soares Vidal

## **1. Introdução**

A biotecnologia vem sendo utilizada pela humanidade há milênios e foi aplicada sem o conhecimento das técnicas biológicas, ressaltando-se que, desde que existe a civilização, há, também, a biotecnologia.

Define-se biotecnologia como a intervenção do homem para desenvolver métodos e criar, assim, novas formas de vida que, mediante a natureza, seriam impossíveis de surgir, Gyves (1994). Na agricultura, a seleção de novas cultivares para adaptação de plantas silvestres ao cultivo é exemplo de biotecnologia, mas também o são a fabricação de pães, queijos, bebidas fermentadas, como vinhos e cervejas, e muitos outros produtos que o homem vem utilizando ao longo dos anos, em seu próprio benefício.

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 engenharia genética permite que seja realizada a introgressão de qualquer gene caracterizado, alterando importantes rotas metabólicas promovendo, com isso, a alteração no tipo e na composição de amido, óleos, proteínas, vitaminas etc., sem levar em consideração as usuais barreiras biológicas (BINSFELD, 2000). Com essas modificações objetiva-se: 1) elevar o valor nutricional dos

alimentos; 2) melhorar o processamento industrial e a comercialização dos produtos; 3) desenvolver plantas transgênicas que funcionem como biorreatores, onde seja possível produzir polipeptídios de valor farmacêutico como, por exemplo, vacinas na forma de antígenos de vírus ou anticorpos, e 4) produzir inúmeras enzimas (proteínas) para fins industriais, além dos benefícios ambientais que a engenharia genética pode trazer, pois a idéia dos produtos transgênicos é, em última análise, tornar a agricultura menos dependente de agrotóxicos e inseticidas (MONTEIRO, 2000).

As técnicas da engenharia genética estão amplamente baseadas no cultivo de tecidos, pois a transformação genética requer o cultivo, *in vitro*, de protoplastos, células e tecidos da planta que se deseja transformar como também das células e tecidos transformados, seja possível obter plantas regeneradas (GYVES, 1994).

## 2. Cultivo de Tecidos Vegetais

A cultura de tecidos vegetais é uma técnica recente visto que os primeiros passos foram dados no início do século XX e os maiores avanços foram notados a partir da segunda metade do século. No anexo 1 tem-se um breve histórico da cultura de tecidos vegetais.

A tecnologia da cultura de células, protoplastos e tecidos de plantas, constitui uma das áreas de maior sucesso, como parte do complexo da biotecnologia e vem sendo ampliada dia-a-dia. Após quase meio século de progresso, esta tecnologia conquistou destacada posição na propagação comercial e industrial de plantas, no melhoramento genético, no manejo, no intercâmbio e na conservação de germoplasma e em outras aplicações, como as pesquisas em fisiologia vegetal e produção industrial *in vitro* de compostos secundários. Também, por meio do cultivo de tecidos se pode regenerar plantas a partir de meristemas para obter material livre de vírus, células isoladas ou massa de tecidos desdiferenciados (calo) para obtenção e seleção de plantas resistentes às condições adversas.

Por cultivo de tecido, ao qual também se faz referência como cultivo *in vitro*, entende-se o conjunto 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 semi-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. No anexo 2 são apresentados alguns conceitos básicos em cultura de tecidos vegetais.

A técnica de cultivo *in vitro* apresenta, portanto, grande potencialidade, favorecendo 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.

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 um meio de cultivo. Este controle é exercido, basicamente, pela adição de substâncias de diversas naturezas ao meio de cultivo. Dentre essas substâncias encontram-se os reguladores de crescimento e alguns nutrientes. Outro ponto de controle leva em conta as condições físicas (iluminação, temperatura, umidade etc) e químicas (pH etc).

Uma planta cultivada *in vitro* tem seu metabolismo heterotrófico e por isso necessita de: água, macro e micronutrientes e carboidrato, como fonte de carbono (PIERIK, 1988).

No cultivo de tecidos são fundamentais, para todas as suas técnicas, a assepsia, o explante, o meio nutritivo e os fatores ambientais: luz, temperatura, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e oxigênio (O<sub>2</sub>), segundo CID, 2001. Para evitar a contaminação dos meios por impurezas minerais, todos os sais utilizados na sua preparação devem ser de qualidade analítica (p.a.)

## 2.1. Aplicações do Cultivo de Tecidos

Várias são as aplicações das técnicas do cultivo de tecidos, a começar pela clonagem, seu lado mais visível, seguida pela cultura de célula (suspensões celulares em meio líquido), tecidos e órgãos para fins práticos, obtenção de plantas haplóides a partir da cultura de anteras, produção de metabólitos secundários em biorreatores, geração de variantes somaclonais, microenxertia, tecnologia dos protoplastos etc. Um dos esteios básicos da chamada biologia molecular de plantas (engenharia genética) depende, em grande extensão, de estratégias e técnicas utilizadas em biologia celular.

### 2.1.1. Micropropagação

A micropropagação ou clonagem é a propagação vegetativa *in vitro*, utilizada principalmente naquelas plantas de difícil multiplicação pelos métodos convencionais, permitindo a obtenção de grande número de plantas saudáveis 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 primeira aplicação comercial da micropropagação foi realizada por Morel (1960), ao multiplicar orquídeas através da cultura de ápices caulinares e regeneração de protocormos (diminutas estruturas que se diferenciavam e davam origem a embriões). A sucessiva divisão desses protocormos possibilitou acelerar o processo de propagação de orquídeas.

Mais tarde, Smith e Murashige (1970) conseguiram desenvolver plantas inteiras a partir de meristemas apicais (sem qualquer primórdio foliar) em meio contendo sais minerais e vitaminas, enriquecido com reguladores de crescimento.

Murashige (1974) apresentou o seguinte esquema padrão para sistemas de micropropagação:

Estádio I - seleção de explantes, desinfestação e cultivo em meio nutritivo, sob condições assépticas

Estádio II - multiplicação dos propágulos através de sucessivas subculturas, em meio próprio para multiplicação

Estádio III - transferência das partes aéreas produzidas para meio de enraizamento e subsequente transplantio das plantas, obtidas para substrato do solo.

Este esquema pode variar conforme as peculiaridades de cada espécie, podendo ser necessária uma fase adicional de alongamento das partes aéreas antes do enraizamento, ou o esquema pode ser simplificado, eliminando-se a etapa de enraizamento *in vitro*, manipulando-se as partes aéreas como microestacas, as quais enraizam diretamente no substrato de transplantio. Um estágio zero é, às vezes, citado, o qual corresponde ao tratamento dado à planta-matriz de onde são retirados os explantes (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990).

Para se fazer a micropropagação, utilizam-se os seguintes métodos:

### 2.1.1.1. Proliferação de Gemas Axilares

Gemas axilares são estimuladas a crescer (Figura 1) formando brotos simples ou tufos de brotos que são divididos, dando origem a novos explantes.

Segmentos apicais ou nodais são adequados como fonte de explantes para o processo de preservação de germoplasma *in vitro*. Tal material apresenta as seguintes vantagens: adaptação às condições *in vitro*; alto grau de valor genético da planta matriz; maior garantia de regeneração, que meristemas ou calos, e economia de espaço para armazenamento.

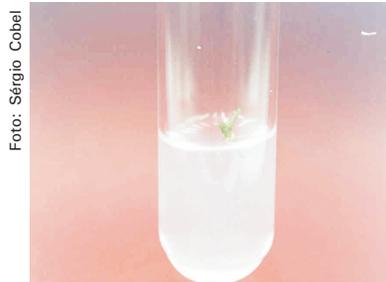


Foto: Sérgio Cobel

**Fig. 1.** Gemas axilares oriundas de algodão *G. hirsutum* cultivadas *in vitro*.

### 2.1.1.2. Indução de Gemas Adventícias Por Organogênese Direta Ou Indireta

Formação de gemas em locais não convencionais (Figura 2) tanto diretamente de tecidos com potencial morfogenético quanto indiretamente, através da formação de calos. Entende-se por calo (Figura 3) um aglomerado de células desorganizadas, formadas por células diferenciadas e não diferenciadas, que se dividem ativamente e que, em geral, se originam em zonas com injúrias químicas ou físicas (BAJAJ, 1989). A definição de protocolo de indução de organogênese a partir de meristema apical, isto é, indução de uma multibrotação das culturas a serem transformadas, aumentaria significativamente a frequência de plantas transformadas (ARAGÃO et al., 1998).



Foto: Sérgio Cobel

**Fig. 2.** Organogênese direta a partir de fragmentos de folha de Violeta africana *Saintpaulia ionantha*



Foto: Julita Maria F. C. Carvalho

**Fig. 3.** Calo friável oriundo de hipocótilo de plântulas de algodão *G. hirsutum* *in vitro*

### 2.1.1.3. Embriogênese Somática

Consiste na formação de embriões somáticos (embrióides) a partir de tecidos somáticos, com constituição idêntica à 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 serem consideradas como células embriogênicas após a divisão celular (PASQUAL et al., 1997). A indução de embriogênese não é muito fácil, senão impossível, no caso de muitas espécies vegetais. Entretanto, quando possível, apresenta várias vantagens sobre as técnicas de micropropagação, dentre elas se destacam: 1) a capacidade de produzir grande número de embriões num espaço limitado; 2) os embriões são individualizados e se desenvolvem diretamente em plantas (LAWRENCE, 1981). Os embrióides podem ser utilizados tanto na continuação da propagação *in vitro* quanto na produção de sementes sintéticas.

As principais limitações da embriogênese somática em plantas perenes, especialmente frutíferas tropicais, são: 1) o baixo número de plantas desenvolvidas em condições de campo, apesar de ser possível o processo de embriogênese, e conseqüentemente, a obtenção de embriões somáticos, em diversas espécies; 2) as dificuldades de obtenções de embriões a partir de partes maduras/adultas das plantas, com a maioria dos sucessos obtidos com tecidos de sementes ou de plântulas (BARROS, 1999). Entretanto, os embriões zigóticos são a fonte para a obtenção das cópias, o que quase sempre não é desejável, por ser desconhecido o valor genético desses indivíduos.

#### 2.1.1.3.1. Embriogênese Direta

Os embriões somáticos são originados diretamente do explante. A ocorrência de embriogênese direta tem sido registrada em tecidos gametofíticos, esporofíticos e em tecidos que se originaram em função da fertilização dos gametas. Este fenômeno ocorre com maior probabilidade em micrósporos 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 embriões somáticos são produzidos a partir de calo. A verdadeira embriogênese indireta (Figura 4) requer que as células diferenciadas de um explante sejam induzidas a formar calos não-diferenciados e, então, algumas

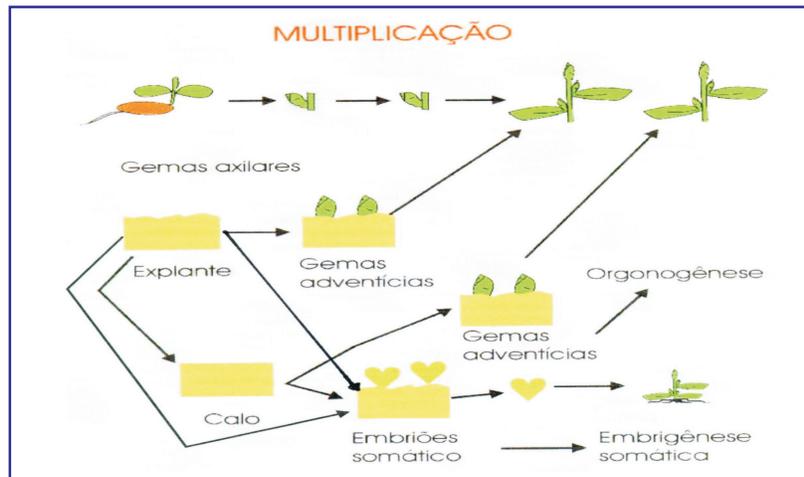
células se tornam comprometidas ou predeterminadas em uma rota embriogênica (BAJAJ, 1992b).

Foto: Julita Maria F. C. Carvalho



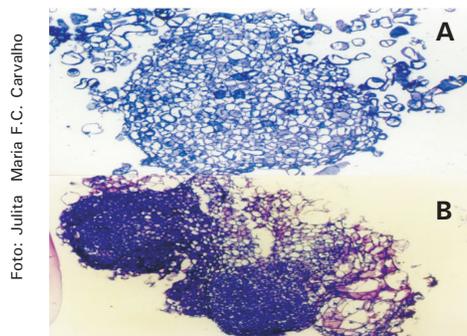
**Fig. 4.** Embriões somáticos de algodão *G. hirsutum*, obtidos a partir de explante de hipocótilo.

Os embriões somáticos podem ser distinguidos de brotos adventícios por serem bipolares, possuindo primórdios radiculares e foliares, eixo e cotilédones e não terem conexão vascular com o tecido parental. Por outro lado, gemas axilares ou adventícias podem induzir a formação de condutos procambiais no tecido parental. 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 (Figura 5).



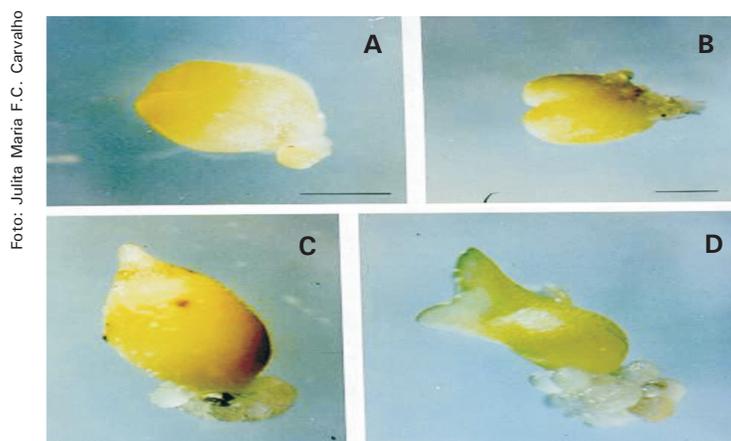
**Fig. 5.** Diagrama mostrando diferença entre propagação a partir de gema e embrião somático.

Os embriões somáticos são formados a partir de células caracteristicamente meristemáticas e, portanto, diferentes das usuais células vacuoladas parenquimatosas (Figura 6b) encontradas em calos e em culturas em suspensão; elas possuem citoplasma denso, núcleo grande e muitos grãos de amido (Figura 6a) (BAJAJ, 1991).



**Fig. 6.** Diferença entre células meristemáticas (A) e células parenquimatosas (B).

As formas dos embriões somáticos correspondentes às distintas fases de desenvolvimento, são: pró-embrião, cordiforme, torpedo e cotiledonar (Figura 7).



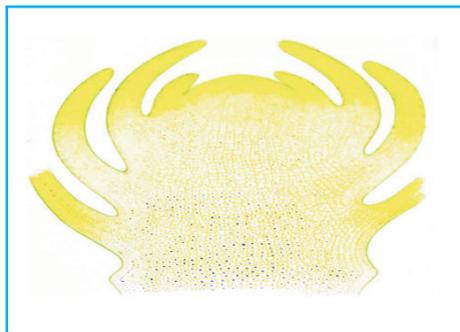
**Fig. 7.** Estádio de desenvolvimento de embrião somático: A- pró-embrião; B- coração; C- torpedo; D- cotiledonar.

### 2.1.2. Cultivo de Meristemas

Os meristemas (Figura 8) são tecidos vegetais formados por grupos de células não diferenciadas (células com algumas características e funções não específicas) que se caracterizam por sua alta atividade de divisão e são responsáveis pelo crescimento dos distintos órgãos da planta (DEBERGE e ZIMMERMAN, 1991).

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

Foto: Ciência & Natureza: Vida das Plantas



**Fig. 8.** Gema formada de domo meristemático, primórdio foliar e porção inferior ao primórdio foliar.

Nos últimos anos, o cultivo de meristemas tem ganhado, em algumas culturas, certa importância, por ser utilizado para a obtenção de tecidos para a transformação genética por agentes biológicos, como *Agrobacterium* (GOULD et al., 1991).

### 2.1.3. Cultivo de Protoplastos

Protoplasto é uma célula cuja parede foi removida por ação enzimática. O cultivo de protoplastos vêm sendo utilizado no melhoramento de espécies de interesse agrônomo, para obtenção de plantas transgênicas, de híbridos somáticos e de mutantes ou variantes somaclonais. Além disso, protoplastos constituem um sistema vegetal para estudo da expressão de genes isolados e sua regulação.

A técnica de isolamento de protoplasto em fumo, foi estabelecida por Nagata e Takebe (1970), a partir de células de mesófilo de folha, a qual vem sendo empregada como metodologia básica em diferentes espécies. Vários parâmetros são importantes para a obtenção de protoplastos viáveis, entre os quais se destacam: a espécie, as condições de desenvolvimento da planta, tipo e idade do explante e as condições de isolamento dos protoplastos. Teoricamente, utilizando-se uma mistura adequada de enzimas pectocelulolíticas, protoplastos podem ser isolados a partir de qualquer tipo de tecido vegetal. Essas enzimas

pectocelulolíticas foram usadas, a princípio, na indústria para produção de sucos de frutas. Elas são isoladas de microrganismos simbióticos, parasitas ou saprofitos, que degradam naturalmente as paredes celulares (CARNEIRO et al., 1998).

As técnicas de obtenção e cultivo de protoplastos são fáceis de manipular e não requerem equipamentos sofisticados, porém a metodologia não pode ser generalizada, pois cada genótipo é um caso particular, necessitando de alguns ajustes específicos na cultura. A etapa limitante na generalização dessa metodologia é a regeneração de plantas.

Apesar de ser possível o isolamento de protoplastos de vários tecidos, as suspensões celulares são ultimamente mais utilizadas, pela facilidade de manipulação e alta eficiência no isolamento. Com o objetivo de regenerar plantas a partir dos protoplastos, células embriogênicas são sempre recomendadas, sobretudo em plantas monocotiledôneas (HORN et al., 1988; MEGIA et al., 1993).

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). As soluções salinas neutralizam as cargas negativas das membranas, e o PEG pode formar pontes moleculares entre certas proteínas da membrana, o que facilita as agregações dos protoplastos (ALDWINCKLE et al., 1982).

A hibridação somática de plantas envolve quatro estágios distintos (PASQUAL et al., 1997): 1) isolamento de protoplasto; 2) fusão de protoplastos; 3) regeneração de plantas a partir de tecidos selecionados e, 4) análise das plantas regeneradas.

#### **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). A seleção *in vitro* tem, como vantagens: 1) as unidades experimentais são mantidas em meio definido e condições controladas, permitindo a seleção de pequenos incrementos em resistência; 2) células cultivadas podem ser expostas ao agente seletivo de

maneira uniforme, reduzindo a possibilidade de escapes; 3) sistemas de cultivo mantidos em pequenos espaços podem, potencialmente, substituir onerosas casas-de-vegetação ou campos de teste, e 4) o agente causador da doença ou outro fator permanece confinado no laboratório.

### 2.1.5 Cultivo de Embriões Zigóticos ou Embriões Imaturos

O cultivo de embriões zigóticos ou embriões imaturos (Figura 9) é usado para obtenção de híbridos entre diferentes espécies, tornando possível, a certas cultivares, a transferência de genes desejáveis. Trabalho pioneiro de cultivo de embriões maduros foi realizado por Hanning (1904), cultivando embriões maduros de *Raphanus sativus*, *R. landra*, *R. caudatus* e *Cochlearia danica*, cuja exigência nutricional consistia de sais minerais, açúcares e aminoácidos.

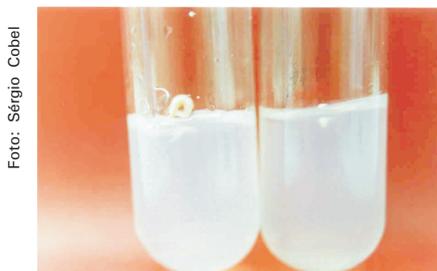


Foto: Sérgio Cobel

**Fig. 9.** Cultivo de embrião zigótico a partir de sementes secas de mamona (*R. communis*).

Desde então, a técnica de cultura de embriões tem-se expandido e ensejado importantes contribuições em estudos básicos da fisiologia do desenvolvimento do embrião, em programas de melhoramento genético, pela recuperação de híbridos de interesse de cruzamentos incompatíveis, bem como para a quebra de dormência de sementes, observada em algumas espécies (FERREIRA et al., 1990).

A medida em que o embrião zigótico se desenvolve, ocorrem mudanças progressivas na sua exigência nutricional, passando de heterotrófico a autotrófico. A distinção entre essas duas fases baseia-se na dependência do embrião pelas substâncias nutritivas armazenadas no endosperma. Inicialmente, o zigoto e o embrião têm, nas fases subseqüentes à fecundação, pouca capacidade de síntese e se utilizam das reservas nutricionais, reguladores de crescimento e outros metabólitos essenciais presentes no endosperma e células acessórias do saco embrionário. Ainda no estágio globular, o embrião continua sendo heterotrófico. Somente a partir do estágio cordiforme final, com início do desenvolvimento dos cotilédones, é que o embrião começa a se tornar independente e autotrófico (RAGHAVAN, 1976).

Hanning (1904) observou que inclusão de sacarose era necessária para a germinação e demonstrou a influência de diferentes fontes de nitrogênio sobre a morfologia do embrião (RAGHAVAN, 1976).

Diversos fatores podem afetar a eficiência e o sucesso da cultura de embriões, porém as condições gerais foram testadas e determinadas por vários pesquisadores, em trabalhos clássicos, desde o início do século.

Para obtenção de híbridos interespecíficos por meio do melhoramento convencional, há necessidade da condução de sucessivas gerações de retrocruzamento com parental recorrente, no sentido de introgridir a característica selvagem no mesmo e recuperar a sua performance; entretanto, este método é limitado em certas espécies, por barreiras de origem biótica: os cruzamentos são incompatíveis ou ocorre a formação do zigoto não viável. Uma alternativa usada para contornar o problema implica na excisão do embrião imaturo e no seu posterior desenvolvimento *in vitro*.

Vários são os fatores que afetam a cultura de embriões *in vitro*, tais como a escolha do meio nutritivo adequado, os reguladores de crescimento utilizados, as substâncias fenólicas liberadas e a própria remoção inadequada do embrião.

### 2.1.6. Cultivo de Anteras

Através do cultivo de anteras pode-se conseguir plantas 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, pela duplicação dos cromossomos das células, mediante tratamento com agentes duplicadores como, por exemplo, colchicina, única etapa substituindo as muitas gerações de autofecundação necessárias no processo usual de obtenção de linhagens.

A cultura de anteras é considerada uma ferramenta importante em programa de melhoramento, pois possibilita a obtenção de linhas 100% homozigotas. A obtenção de plantas puras em gerações segregantes acelera o processo de obtenção de novas cultivares em vários anos (FERNANDES, 1990).

As plantas haplóides podem ser obtidas tanto diretamente por embriogênese, quanto indiretamente, via formação de calos. Na androgênese direta o micrósporo se comporta como um zigoto, passando por vários estádios de embriogenia, semelhante ao que ocorre *ex vitro*. Na androgênese indireta se dividem e formam calo. As plantas derivadas de calos podem apresentar variações genéticas.

Segundo Nitsch (1983), alguns fatores influenciam a obtenção de plantas haplóides viáveis através da cultura de anteras ou pólen, como: a viabilidade do pólen, vigor que a planta apresenta no estágio homozigoto, e a reação das plantas haplóides em relação aos agentes duplicadores dos cromossomos.

## 2.2. Fatores que Influem no Êxito do Cultivo De Tecidos

### 2.2.1. Origem e Tipo do Material Vegetal

São, talvez, o fator mais importante. Cada espécie ou variedade se comporta de maneira diferente, e têm grande influência a idade da planta e suas condições prévias no campo, a época da coleta, o tipo de explante, a posição que este ocupa na planta e uma larga lista de aspectos, próprios do material vegetal, que dificilmente podem ser controlados em sua totalidade. O material cultivado *in vitro* tem que estar livre de microrganismos que possam interferir durante o processo (PIEREK, 1988).

### 2.2.2. Composição do meio de cultivo

O meio de cultivo desempenha várias funções pois, ao mesmo tempo em que serve de suporte físico para o explante, proporciona-lhe os nutrientes necessários à sua sobrevivência; além disso, tal como se indicou anteriormente, os componentes do meio podem ser utilizados para dirigir o crescimento e o desenvolvimento do material vegetal (GEORGE, 1996). O meio de cultivo pode ser líquido ou solidificado com ágar ou outro tipo de agente gelificante (CARVALHO, 1996). Existem vários meios de cultivo, entretanto, o mais amplamente utilizado é o formulado por Murashige e Skoog (1962), de denominação MS. Os componentes deste meio e suas concentrações, são listados na Tabela 1

#### 2.2.2.1. Reguladores de Crescimento

##### a) Auxinas

É um grupo de reguladores de crescimento utilizados para induzir o desenvolvimento de nós, formação de calo e desenvolvimento de raízes adventícias. As auxinas utilizadas com maior frequência em cultivo *in vitro*, são: ácido indol-3-acético (AIA), ácido indol-3-butírico (AIB), ácido  $\mu$ -naftalenoacético (ANA) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D). O AIA é uma auxina que, comumente, é adicionada a concentrações relativamente elevadas (1-30 mg/l) devido ao fato de se decompor na presença de luz, mediante oxidação enzimática. As outras auxinas mencionadas são sintéticas e mais ativas utilizando-se, portanto, em concentrações inferiores.

##### b) Citocininas

Trata-se de um grupo de reguladores de crescimento que estimulam a divisão

**Tabela 1.** Composição das soluções concentradas utilizadas para a preparação do meio de cultivo MS.

<b>Solução A (Macronutrientes)</b>	<b>mg/L</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	16.500
KNO <sub>3</sub>	19.000
CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	4.400
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	3.700
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.700
<hr/>	
<b>Solução B (Micronutrientes)</b>	<b>mg/L</b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.200
MnSO <sub>4</sub> * 4H <sub>2</sub> O	16.900
ZnSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	8.600
<b>KI</b>	<b>830</b>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	250
CuSO <sub>4</sub> * 5H <sub>2</sub> O	25
CoCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O	25
<hr/>	
<b>Solução C (Fonte de ferro):</b>	<b>mg/L</b>
Na <sub>2</sub> EDTA * 2H <sub>2</sub> O	3.725
FeSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	2.785
<hr/>	
<b>Solução D (Vitaminas e outros suplementos orgânicos):</b>	<b>mg/L</b>
Mio inositol	10.000
Tiamina-HCl	10
<b>Piridoxina-HCL</b>	<b>50</b>
Ac. Nicotínico	50
Glicina	200

Fonte: Murashige e Skoog, 1962.

celular, sobretudo junto de uma auxina. As citocininas mais utilizadas em cultivo *in vitro*, são: kinetina (KIN), zeatina (citocinina natural), 6-benzilaminopurina (BAP ou BA) e 6-(g,g-dimetilimidino) purina (2iP). Em concentrações elevadas induzem à formação de brotos adventícios e inibem a formação de raízes; são, assim, responsáveis pela eliminação da dormência apical, promovendo o desenvolvimento das gemas axilares.

### c) Giberelinas

São reguladores de crescimento que induzem o desenvolvimento dos nós e o crescimento dos meristemas, ou gemas *in vitro*; podem, também, romper a dormência de embriões isolados ou gemas e inibir a formação de raízes e brotos adventícios, e são utilizados com menor frequência que as auxinas e as citocininas. Dentro das giberelinas, o ácido giberélico (GA3) é o mais

empregado. Deve-se ter em conta que o GA3 perde 90% de sua atividade ao se esterilizar junto ao meio no autoclave (PIERIK, 1988).

### 2.2.3. Condições de Incubação

Não é comum que as condições de incubações variem muito de um cultivo a outro ainda que sua importância seja equiparável à dos demais fatores de cultivo. Embora cada planta, explante e período de cultivo, possa ter seus requerimentos específicos, é comum utilizar-se a qualidade e a intensidade de luz, fotoperíodos e termoperíodos, mais ou menos padronizados. Por exemplo, para culturas tropicais uma intensidade luminosa de 2.500 lux com um fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas no escuro e uma temperatura de 25 °C a 30°C (MONTROYA HENAO, 1991) .

Combinando-se adequadamente esses três fatores (material vegetal, meio de cultivo e condições de incubação) conseguir-se-á obter, no material vegetal, alguns dos seguintes processos morfogênicos:

- desenvolvimento dos meristemas já existentes no explante;
- organogênese, isto é, formação de multibrotação e/ou raízes adventícias;
- embriogênese assexual, ou seja, formação de embriões somáticos

(embrióides) a partir de células que não são produto de fusão gamética e,

- desdiferenciação (conversão de células diferenciadas em células não diferenciadas, ou seja, meristemáticas) de tecidos e proliferação de massa de calo.

## Anexo 1: Histórico da Cultura de Tecidos Vegetais

Apresenta-se, neste anexo, um histórico sucinto, visando oferecer uma idéia das bases e da evolução da cultura de tecidos vegetais.

Em 1838, Schleiden e Schwann levantaram a hipótese de que toda célula tinha capacidade de gerar um indivíduo.

Em 1892, Sachs definiu que as plantas sintetizam substâncias capazes de formar órgãos e que apresentam distribuição de forma polar.

Em 1902, Haberdandt tentou demonstrar a totipotencialidade das células das plantas, a partir de material maduro, e obteve pouca expansão, porém não conseguiu divisão celular. O desconhecimento dos reguladores de crescimento contribuiu para este insucesso.

Em 1904, Hanning foi o primeiro a cultivar embriões imaturos de crucíferas *in vitro* com sucesso.

Em 1922, Robbins e Kotte mantiveram, com sucesso, raízes de gramíneas em meio de cultura.

Em 1925, Laibach aplicou o cultivo de embriões a cruzamentos interespecíficos de *Linum*.

Os progressos na cultura de tecidos só foram possíveis a partir da década de 30.

Em 1934, White manteve o crescimento de ápices de raízes de tomate, em meio líquido, por um período ilimitado. Neste mesmo ano, Kogh et al. identificaram o primeiro fitohormônio, a auxina, ácido indolilacético.

Em 1939 Gautheret e Nocourt estabeleceram um protocolo para a manutenção de cultura de calo de cenoura. Neste mesmo ano, White conseguiu manter calo de fumo em meio contendo AIA.

Outros méritos no avanço das técnicas de cultivo *in vitro* são devidos às observações de Van Overbeek et al. (1941) que promoveram a diferenciação e o crescimento de calo a partir de embriões de *Datura stramonium*, pela inclusão de leite de coco no meio de cultivo.

Em 1946, Ball regenerou plantas de *Lupinus* e *Tropaelum*, a partir de ápices caulinares.

Em 1948, Skoog e Tsui demonstraram a regulação química da formação da parte aérea e raiz, em calo de fumo.

Em 1952, Sussex e Steve, trabalhando com primórdio foliar, observaram que este originava uma planta. Neste mesmo ano, a suplementação do meio de cultura com auxina e leite de coco permitiram que Steward e Caplin (1952) obtivessem formação de calo em diversas espécies de plantas. Também em 1952, Morel e Martin recuperaram plantas de dália livres de Vírus do Mosaico pela cultura de ápices caulinares

Em 1953, Tulecke obteve calo haplóide a partir do cultivo de pólen de *Ginkgo biloba*.

No período de 1953 a 1954, Muir observou que células colocadas em meio de cultura continuavam se multiplicando.

Em 1954, Muir et al. obtiveram a primeira planta, a partir de uma célula isolada.

Com a descoberta da cinetina (primeira citocinina) por Miller et al. (1955), foi possível demonstrar-se que a diferenciação da parte aérea, raiz ou ambos, em calo de fumo, era regulada pelo balanço hormonal auxina/citocinina. A partir desta descoberta houve grandes avanços no estudo da cultura de tecidos vegetais.

Em 1958, Wickson e Thimann observaram que quando se aplicava cinetina a uma gema terminal ou lateral dormente, esta saía da dormência. No mesmo ano, Reinert e Steward et al. (1958) obtiveram formação de embriões somáticos a partir de calo de cenoura, e Maheswari e Rangaswamy estudaram a cultura de núcelos e a regeneração de embriões somáticos em *Citrus*.

Em 1959, Melchers e Bergmann constataram uma variação na ploidia com o avanço do tempo em que o explante permanecia no meio de cultura.

Em 1960, Morel recuperou cultivares de orquídeas livres de vírus, mediante cultura de meristemas, trabalhando com ápice caulinar (meristema + primórdio foliar + porção inferior ao primórdio foliar) demonstrando a potencialidade das aplicações comerciais da micropropagação.

O método de isolamento de protoplastos de plantas com enzima de degradação da parede celular, foi desenvolvido por Cocking (1960).

Murashige e Skoog elaboraram, em 1962, o meio de cultura conhecido universalmente, denominado meio MS. Também em 1962 Kanta et al. obtiveram sucesso na polinização *in vitro* de *Papaver somniferum*. Óvulos isolados eram colocados em cultura e, em seguida, grãos de pólen eram depositados sobre os mesmos, ocorrendo o desenvolvimento do tubo polínico, a fecundação, a formação do embrião e, posteriormente, a obtenção de sementes.

Já em 1965, Aghion-Prat induziu a floração *in vitro* em tecidos de fumo.

Em 1966, Guha e Maheswari foram os pioneiros na indução de androgênese *in vitro* em *Datura*, a partir de grãos de pólen, mediante cultura de anteras.

Smith e Murashige obtiveram, em 1970, a formação de plantas pela cultura de meristemas propriamente dito (porção distal ao mais novo primórdio foliar)

O método de exclusão de viroses e viróides em plantas de *Citrus* foi desenvolvido por Murashige et al. (1972) e consistia na garfagem de ápices caulinares (meristemas com dois primórdios foliares) em porta-enxerto *in vitro*. Ainda neste mesmo ano, Carlson et al. (1972) comunicaram a primeira fusão de protoplastos, obtida em *Nicotiana*.

Em 1974, Reinhard iniciou estudos sobre a biotransformação de tecidos vegetais e Zaenen et al. descobriram que o plasmídeo "Ti" é o princípio indutor de tumores de *Agrobacterium*, uma bactéria de grande importância na transformação genética em protoplastos vegetais.

Em 1978, Melchers et al. conseguiram híbridos somáticos entre batata e tomate.

Em 1982, Krens et al. alcançaram a incorporação de DNA isolado por protoplastos, tornando possível a transformação de células vegetais a partir de um DNA isolado. Neste mesmo ano, Zimmermann obteve a fusão de protoplastos, através de estímulo elétrico.

Em 1985, Horsch et al. obtiveram a infecção e a transformação genética de disco foliares de tabaco com *Agrobacterium*, bem como a regeneração das plantas transformadas.

No Brasil, os trabalhos pioneiros com cultura de tecidos foram desenvolvidos no Instituto Biológico, na década de 1950. A primeira equipe de cultura de tecidos foi formada em 1971, na ESALQ, em Piracicaba, SP.

Entre 1975 e 1980 foram criados os laboratórios da Universidade de Campinas,

do Instituto Agronômico de Campinas e da EMBRAPA. Atualmente, a maioria das instituições tem laboratório nesta área, trabalhando com diferentes metodologias de manipulação de plantas *in vitro*.

## ANEXO 2: Conceitos Básicos em Cultura de Tecidos Vegetais

Na cultura de tecidos, como qualquer outra área do conhecimento, existem termos e conceitos básicos, os quais devem ser conhecidos por quem trabalha ou quer trabalhar na área. Neste anexo, são apresentados os conceitos de uso mais freqüente na cultura de tecidos vegetais.

- » **Adulto:** fase do ciclo vital, na qual uma planta tem alcançado o grau de maturidade suficiente para florescer ou reproduzir.
- » **Aclimação:** processo de adaptação da planta às condições ambientais, após sua transferência da condição *in vitro*, antes do transplante para o local definitivo.
- » **Adventício:** estruturas ou órgãos desenvolvidos fora do seu lugar normal de desenvolvimento, a partir de tecido adulto, num ponto de iniciação não predeterminado, por exemplo, embriões a partir de qualquer célula que não seja zigoto; folhas e ramos a partir de raízes.
- » **Ágar:** produto extraído de algas marinhas, utilizado para solidificar o meio de cultura.
- » **Água deionizada, desmineralizada ou destilada:** água livre de certas impurezas, particularmente sais e diversos íons.
- » **Androgênese:** partenogênese masculina ou o desenvolvimento haplóide de uma plântula ou de suas partes, a partir de gameta masculino.
- » **Aneuploidia:** perda ou ganho de cromossomos através de vários processos que resultam em complementos cromossômicos anormais na metáfase.
- » **Antioxidantes:** produtos químicos que evitam a oxidação.

- » **Ápice caulinar:** estrutura formada pelo meristema apical acompanhado de primórdios foliares e tecidos adjacentes da haste.
- » **Apomixia:** reprodução assexual que resulta na formação de um embrião sem prévia fertilização, a partir de uma única célula ou de um conjunto de células.
- » **Assepsia:** no cultivo *in vitro*, significa ausência de qualquer microrganismo.
- » **Asséptico:** substância, local, equipamento livre de fungos, bactérias, vírus, micoplasmas e outras contaminações orgânica.
- » **Autoclavagem:** fornecimento de calor sob pressão, com o objetivo de proceder à esterilização.
- » **Autotrófico:** organismo que utiliza CO<sub>2</sub> como única fonte de carbono para síntese de suas biomoléculas.
- » **Autotróficas:** plantas ou outros organismos capazes de sintetizar suas próprias substâncias orgânicas, a partir de componentes inorgânicos simples, mediante fotossíntese ou quimiossíntese.
- » **Auxinas:** grupo de reguladores de crescimento vegetal, quimicamente ou funcionalmente relacionados ao hormônio natural AIA (ácido indolacético) que causam alongamento celular, dominância apical, enraizamento e outros fenômenos.
- » **Auxotrófica:** células ou organismos cujos crescimento e desenvolvimento dependem da presença, no meio de cultura, de suplementos, porque não são capazes de sintetizar certos metabólitos essenciais, necessitando da adição de nutrientes exógenos.
- » **Biotecnologia:** conjunto de técnicas específicas para modificação e melhoria dos sistemas biológicos, ou seja plantas, animais, microrganismos, células em cultivo ou produtos derivados.
- » **Calo:** aglomerado de células não organizadas, irregularmente diferenciadas, que se multiplicam desordenadamente e se desenvolvem a partir de tecidos vegetais, normalmente em resposta a injúrias químicas ou físicas.
- » **Calogênese:** indução e desenvolvimento de calos.

- » **Célula diferenciada:** qualquer célula não meristemática.
- » **Célula não diferenciada:** célula meristemática.
- » **Câmara de crescimento ou de cultivo:** câmara com controle de iluminação, fotoperíodo e temperatura, na qual são mantidos os cultivos.
- » **Câmara de fluxo laminar:** câmara para manipulação do material vegetal asséptico, utilizada nas operações de estabelecimento e transferência dos cultivos, que mantêm em seu interior um ambiente livre de agentes contaminantes por meio de um fluxo não turbulento e contínuo de ar estéril.
- » **Citocininas:** grupo de reguladores de crescimento vegetal, quimicamente ou funcionalmente relacionados ao hormônio natural zeatina, que causam divisão celular, diferenciação celular e de brotos, quebra de dormência apical e outros fenômenos.
- » **Clonagem:** tem pelo menos dois significados distintos: 1) ato de se obter novas culturas através de subcultivos mantendo a identidade genética do material, e 2) isolar uma seqüência de DNA em uma molécula vetora (o que possibilita sua conservação e multiplicação).
- » **Clone:** conjunto de células, tecidos, plantas ou animais, obtidos assexualmente ou por partenogênese, a partir de um único indivíduo, o que possibilita a obtenção de um novo indivíduo com a mesma carga genética do indivíduo a partir do qual foi gerado.
- » **Criopreservação:** conservação de material biológico em nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ , ou em sua fase de vapor, a  $-150^{\circ}\text{C}$ .
- » **Cultura em suspensão:** cultura de células individuais, agregados ou tecidos em meio líquido, freqüentemente sob agitação para fornecer aeração adequada.
- » **Densidade crítica de células:** menor inóculo a partir do qual se pode desenvolver um novo cultivo em suspensão. Número de células por unidade de volume.
- » **Desinfecção:** eliminação de microrganismos localizados internamente nos tecidos.
- » **Desinfestação:** eliminação de microrganismos localizados na superfície do tecido ou órgão.

- » **Desdiferenciação:** conversão das células diferenciadas ao estado meristemático e ocorre quando os tecidos são feridos.
- » **Diferenciação:** série de modificações relativamente permanentes e irreversíveis, que ocorrem em células meristemáticas e resultam em distinções entre os tipos de células de um organismo, desenvolvendo células ou tecidos com características e função específicas.
- » **Diplóide:** célula ou planta com duas vezes o número básico de cromossomos (2n).
- » **Dominância apical:** anulação do crescimento das gemas laterais pela gema apical.
- » **Embrião:** estado precoce de desenvolvimento de uma planta, consistindo de primórdio de raiz, broto e folhas.
- » **Embriogênese:** processo de iniciação e desenvolvimento de embrião que pode ser sexual (embrião zigótico, embriogênese propriamente dita) ou assexual (embrião somático, embriogênese somática).
- » **Embrióide:** estrutura semelhante ao embrião, porém originária de uma célula somática. Também é chamado embrião somático ou embrião adventício.
- » **Epigenético:** qualquer mudança no fenótipo que não é resultante de uma alteração na seqüência do DNA.
- » **Esterilização:** consiste na eliminação de todos os microrganismos; normalmente efetuado por autoclavagem.
- » **Ex vitro:** desenvolvido fora do recipiente de cultivo.
- » **Explante:** fragmento de tecido ou órgão de plantas utilizado para se iniciar uma cultura *in vitro*.
- » **Fitohormônios:** compostos naturais que regulam o desenvolvimento das plantas. Os principais grupos incluem auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno.
- » **Gema axilar:** refere-se à gema localizada na axila das folhas.
- » **Gametoclone:** propagação clonal de gametas (pólen, óvulos).

- » **Gametófito:** células e tecidos da fase haplóide do ciclo vital das plantas.
- » **Gametoplasma:** conjunto de materiais hereditários de uma espécie.
- » **Gene:** unidade do material de herança; seqüência ordenada de nucleotídeos que compreende um segmento de DNA.
- » **Gene marcador de seleção:** são aqueles que codificam para uma proteína, geralmente com atividade enzimática, ou para outro produto que irá conferir, às células transformadas da planta, resistência a um determinado substrato, permitindo distinguir células transformadas de não transformadas.
- » **Gene repórter:** são aqueles que codificam para uma proteína, geralmente de atividade enzimática, cujo produto é facilmente detectado. Esses genes são marcadores que possibilitam identificar ou marcar células transformadas sem, contudo, eliminar as células não transformadas.
- » **Giberelinas:** grupo de reguladores de crescimento que induzem o alongamento dos entrenos e o crescimento dos meristemas ou gemas *in vitro*. Também podem romper a dormência dos embriões isolados ou gemas e inibir a formação de raízes e gemas adventícias.
- » **Habituação:** capacidade necessária para as células crescerem e se dividirem independentemente de reguladores de crescimento. Geralmente, depois de um certo período das células ou tecidos em cultivo, este fenômeno reduz as concentrações de reguladores de crescimento necessárias para permanência a uma terminada resposta.
- » **Haplóide:** condição correspondente a um conjunto único de cromossomos não pareados em cada núcleo. É característica dos gametas.
- » **Heterotrófico:** organismo que requer substâncias orgânicas como fonte de carbono, para a síntese de biomoléculas.
- » **Indexação:** processo de detecção de patógenos em plantas ou culturas, visando à identificação de plantas sadias.
- » **Indução:** remoção do agente de repressão, permitindo a iniciação de um processo.

- » **Inocular:** em cultivo de tecidos, significa introduzir células, tecidos, órgãos ou organismos em ou sobre um meio de cultivo.
- » **In vitro:** cultivo de qualquer material vivo, em condições assépticas, sobre um meio sintético determinado sob condições ambientais controladas.
- » **In vivo:** referente a fenômenos que ocorrem nas células ou organismos vivos, normalmente fora do ambiente de cultivo de tecidos.
- » **Juvenilidade:** fase do ciclo vital de uma planta determinado por características específicas e sua incapacidade de manifestar a reprodução sexual. Em condições de cultivo *in vitro*, este material se caracteriza por possuir elevada capacidade morfogênica.
- » **Lux:** unidade de medida da luz incidente que ilumina uma superfície de 1 m<sup>2</sup> situada a 1 m da fonte de irradiação.
- » **Macroelementos:** grupo de elementos essenciais requeridos em concentrações relativamente elevadas na nutrição mineral das plantas.
- » **Meio líquido:** meio nutritivo em estado líquido, sem agente solidificante.
- » **Meio sólido ou semi-sólido:** meio nutritivo, solidificado por um agente como o ágar, gelrite etc.
- » **Meristema:** tecido vegetal formado por grupos de células não diferenciadas, que se caracterizam por sua alta atividade de divisão e são responsáveis pelo crescimento dos distintos órgãos da planta.
- » **Meristemóide:** uma célula com características que se assemelham àquelas do embrião, ou meristema apical e capaz de manifestar sua totipotência, originada por diferenciação de células do calo.
- » **Microelemento:** grupo de elementos essenciais requeridos em concentrações relativamente pequenas na nutrição mineral das plantas.
- » **Micropropagação:** técnica de propagação assexual de plantas, mediante o cultivo *in vitro*.
- » **Micrósporo:** esporo haplóide, uninucleado, que se desenvolve no grão de pólen.

- » **Morfogênese:** conjunto de fenômenos que dão origem a um tecido, órgão ou organismo. Evolução de uma estrutura desde um estado indiferenciado até um estado diferenciado.
- » **Órgão:** conjunto de tecidos que atuam como unidade estrutural ou funcional (raiz, gema, folha, flor, fruto).
- » **Organogênese:** processo de diferenciação no qual se formam órgãos vegetais novos, a partir de estruturas preexistentes.
- » **Oxidação:** escurecimento de tecidos cortados que resulta da reação de compostos fenólicos, liberados ao meio, com o oxigênio.
- » **pH:** logaritmo da concentração de íons de hidrogênio convertido em sinais; medida da acidez ou basicidade.
- » **P/V:** peso/volume: indica a concentração de um composto sólido em água. Exemplo: glicose a 2%, significa 20g/1000ml.
- » **Partenogênese:** desenvolvimento do embrião a partir de óvulos não fertilizados.
- » **Primórdio:** estágio rudimentar de um órgão que começa a se formar.
- » **Propágulo:** qualquer parte vegetativa de uma planta, destinada à propagação.
- » **Protoplasto:** célula desprovida da parede celular.
- » **Regeneração:** resposta morfogênica a um estímulo, que resulta na produção de órgãos, embriões ou plantas completas.
- » **Regulador de crescimento:** composto orgânico natural ou sintético que, a baixas concentrações, promove, inibe ou modifica o crescimento e o desenvolvimento da planta.
- » **Repicar:** subdividir uma cultura e transferi-la para um meio novo.
- » **Rizogênese:** indução e desenvolvimento de raízes.
- » **Senescência:** degradação celular, culminando com a morte das células.
- » **Somaclone:** propagação clonal de células somáticas.

- » **Somática:** refere-se aos processos e estruturas que envolvem as células de um organismo, exceto das células reprodutivas.
- » **Subcultura (Repicagem):** transferir para um meio novo pequenas porções do material cultivado.
- » **Tecido:** grupo de células com características comuns.
- » **Tecido diferenciado:** qualquer tecido não meristemático, inclusive o calo.
- » **Tecido não diferenciado:** tecido meristemático (é um tecido organizado, mas não diferenciado).
- » **Tecido não organizado:** calo.
- » **Tecido organizado:** qualquer outro tecido, exceto o calo.
- » **Termolábil:** substância que se decompõe com o calor.
- » **Termoterapia:** tratamento com temperaturas elevadas, objetivando-se principalmente a desativação de vírus.
- » **Totipotência:** capacidade de células individuais expressarem o fenótipo da planta completa da qual foram derivadas.
- » **Volume/Volume (V/V):** indica a concentração de um composto líquido, por exemplo: 3ml/1000ml de ANA.
- » **Varição somaclonal:** variação observada em plantas obtidas por cultivo *in vitro* de tecidos somáticos que pode ser transmitida sexualmente.
- » **Vitrificação:** manifestação fisiológica devido provavelmente, ao excesso de absorção de água em cultura de tecidos, tornando os brotos quebradiços (vitrificados).
- » **Zigoto:** células diplóides resultantes da fusão de gametas.

### 3. Referências Bibliográficas

ALDWINCKLE, T.S.; AHKONG, Q.F.; BANGHAM, A.D.; FISCHER, D.; LUCY, J.A. Effects of polyethylene glycol liposome and erythrocytes: permeability changes and membrane fusion. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.689, p. 548-560, 1982.

ALTMAN, D.W. **Introgessão de genes para melhoria do algodão**: contraste com cruzamento tradicional com a biotecnologia. [S.l.]: Monsanto do Brasil, 1995.

AMMIRATO, P.V.; EVANS, D.A; SHARP, W.R.; YAMADA, Y. **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan,1984. v.3.

AMMIRATO, P.V.; EVANS, D.A; SHARP, W.R.; BAJAJ, Y.P.S., **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan,1990. v.5.

ARAGÃO, F.J.L.; VIANNA, G.R.; RECH, E.L. Feijão transgênico. **Bio-tecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.1, p.46-49,1998.

BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in agriculture and forestry 7**: Medicinal and Aromatic Plant II. Berlin: Springer-Verlag, 1989.

BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in agriculture and forestry 15**: Medicinal and Aromatic Plant III. Berlin: Springer-Verlag, 1991.

BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in agriculture and forestry 19**: High-tech and Micropropagation Plant III. Berlin: Springer-Verlag, 1992a.

BINSFELD, P.C. Análise diagnóstica de um produto transgênico. **Bio-Tecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 12, p. 16-19, 2000.

BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in agriculture and forestry 20: High-tech and Micropropagation Plant IV**. Berlin: Springer-Verlag, 1992b.

BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in agriculture and forestry 21: Medicinal and Aromatic Plants IV**. Berlin: Springer-Verlag, 1993

CARNEIRO, V.T.C. de; CONROI, T.; BARROS, L.M.G.; MATSUMOTO, K. Protoplastos: Cultura e aplicações. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPq, 1998. p.413- 458.

CARVALHO, J.M.F.C. **Aplicación de las técnicas de cultivo in vitro en la multiplicación y mejora del algodón**. 1996. 174p. Tese doutorado. E.T.S.I.U.P.M., 1996.

CID, L.P.B. A propagação *in vitro* de plantas. O que é isso? **Bio-tecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.19, p. 16-21, 2001.

CIÊNCIA & natureza: Vida das plantas. Rio de Janeiro: Ed. Abril, 1997. 151 p.

DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN. **Micropropagação**. [S.l.]: Academic Press, 1991.

FERNANDES, M.I.B.M. de Obtenção de plantas haplóides através da cultura de anteras. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. eds. **Técnicas e aplicação da cultura de tecidos de planta**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA/CNPq, 1990. p.311-332.

FERREIRA, A.G.; HU, C.Y.; SANTAREM, E.R. Somatic embryogenesis of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill), Brazilian cultivars ivorá and IAS-5. **Phyton**, v.51, p.139-144, 1990.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. Basingstoke: Edington, 1996.

GYVES, E.M. **Agrobiotecnologia**. México: Iberoamérica, 1994.

GOULD, J.M.; BANISTER, S.; HASEGAWA, ; FAHIMA, M.; SMITH, R.H. Regeneration of *Gossypium hirsutum* and *G. barbadense* shoot apex tissues for transformation. **Plant Cell Reports**, v.10, p.12-16, 1991.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C. ed. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de planta**. Brasília: ABCTP/

EMBRAPA-CNPQ, 1990. p.99-169.

HANNIG, E. Zur physiologie pflanzlicher embryonen. 1.Ueber die cultur von cruciferen-embryonen ausserhalb des embryosack. **Botanic Ztg.**, v.62, p.45-80, 1904.

HORN, M.E.; CONGER, B.V.; HARMS, C.T. Plant regeneration from protoplasts of embryogenic suspension cultures of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) **Plant Cell Reports**, v.7, p. 371-374, 1988.

MEGIA, R.; HAICOUR, R.; TIZROUTINE, S.; BUI TRANG, V.; ROSSIGNOR, L.; SIHACHAKR, D.; SCHWENDIMAN, J. Plant regeneration from cultured protoplasts of the cooking banana cv. Bluggoe (*Musa* spp., group) **Plant Cell Reports**, v.13, p.41-44, 1993.

MONTEIRO, A.J.L.C. A biotecnologia no Brasil. **Bio-tecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.3, p.26-27, 2000.

MONTOYA HENAO, M.L. **Cultivo de tejidos vegetales**. Medellín: Universidad Nacional de Colombia, 1991.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review of Plant Physiology**, v.25, p. 135-166, 1974.

MOREL, G. Producing virus-free cymbidiums. **American Orchid Society Bulletin**, v. 29, p. 495-497, 1960.

NAGATA, T.; TAKEBE, I. Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts. **Planta**, v. 92, p. 301-308, 1970.

NITSCH, C. Progress in anther and pollen culture technique. In: BEIJING, B. ed. **Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement**. Beijing, Science Press, 1983. p.1-10.

PASQUAL, M.; CARVALHO, G.R.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. **Cultura de tecidos: tecnologia e aplicações: aplicações no melhoramento genético de plantas**. Lavras: [s.n.], 1997.

PIERIK, R.L.M. **Cultivo In vitro de las plantas superiores**. Madrid: Mundiprensa, 1988.

RAGHAVAN, V.; TORREY, J.G. Effects of certain growth substances on the growth and morphogenesis of immature embryos of capsella in culture. **Plant Physiology**, v.39, p. 691- 699, 1976.

ROCA, W.M.; ARIAS, D.I.; CHÁVES, R. Métodos de conservación in vitro del germoplasma. In: ROCA,W.M.; MROGINSKI, L.A. ed. **Cultivo de tejidos en la agricultura**. Cali: [s.n.], 1991. p.696-713.

SMITH, S.M.; MURASHIGE, T. *In vitro* development of the isolated shoot apical meristem of angiosperms. **American Journal Botany**, v.57, p. 562-568, 1970.



**Embrapa**

---

**Algodão**



Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento

