

APLICAÇÕES DA CULTURA DE TECIDOS NO MELHORAMENTO DE PLANTAS*

Juan A. Rodríguez

Pesquisador Assistente (CEPLAC/CEPEC/DIBOT)

A cultura de tecidos é um método que consiste em isolar qualquer parte da planta (explante), seja uma célula, um tecido, ou um órgão, para cultivá-la em condições assépticas, sobre um meio nutritivo artificial. Qualquer célula no organismo vegetal contém toda a informação genética necessária à regeneração de uma planta completa, fenômeno que é denominado de totipotência. Entre os fenômenos morfogenéticos que ocorrem *in vitro*, pode-se diferenciar:

a) Quanto ao mecanismo de regeneração:

- Morfogênese por via direta: diferenciação de meristemas apicais, ou seja, plantas regeneradas geneticamente idênticas à planta matriz e rediferenciação de células de outros tecidos organizados.
- Morfogênese por via indireta: a rediferenciação das células de qualquer tecido em calo; de diferenciação das células do calo em meristemóides e diferenciação dos meristemóides em órgão ou planta completa.

b) Quanto ao grau de organização atingido:

- Embriogênese: a regeneração de uma planta a partir de uma única célula.
- Organogênese: a obtenção de um único órgão, seja ramo, raiz, folha ou flor.
- Formação de estruturas rudimentares parcialmente organizadas, como protocornos e bulbilhos, que se multiplicam indefinidamente por brotação lateral, originando outras estruturas semelhantes, as quais eventualmente se transformam em embrióides.
- Multiplicação celular desordenada, que é a rediferenciação do explante em calo ou aglomerados de células que se multiplicam desordenadamente e indefinidamente, sem atingir nenhum grau de organização.

A organogênese é dependente do balanço entre auxinas e citocininas fornecidas no meio. Tendo maior concentração de auxina que citocinina, obtém-se raiz ou calo e, ao contrário, maior concentração de citocinina que auxina origina brotos.

Dependendo da fonte de material vegetal a ser inoculada no meio de cultura, podemos ter as seguintes culturas: ¹

- calos

(*) Palestra proferida durante o VIII Encontro Regional de Botânicos, realizado na UEFS, durante o período de 11 a 14 de agosto de 1986.

- células em suspensão
- protoplastos
- anteras
- órgãos, inclusive, meristema

CALOS

Os calos consistem num crescimento de células indiferenciadas, originadas, principalmente por proliferação, a partir de tecidos cortados. Eles podem ser estimulados por reguladores de crescimento, dependendo da espécie e da parte da planta utilizada. Em geral, dicotiledôneas reagem melhor à indução e ao crescimento de calos que monocotiledôneas. Em adição, o desenvolvimento é afetado pelo tamanho do explante, tipo de cultura e polaridade do explante no meio. Explantes pequenos são mais propensos a formar calos e explantes grandes têm potencialidade para morfogênese.

Tecidos de calos derivados do explante inicial podem ser mantidos em estado de crescimento ativo pela transferência de fragmentos do calo para meio novo, com a mesma composição. Isso incrementa a friabilidade de tecido, o que facilita obter culturas de células em suspensão. Os calos podem ser mantidos separadamente por um longo período através de contínuas subculturas, mas há perda do potencial para regeneração após subculturas por muito tempo.

CÉLULAS EM SUSPENSÃO

Células em suspensão consiste em células derivadas de calos, transferidas para meio líquido em frascos de agitação contínua ou fase estacionária. A vantagem dessa técnica é que suaves pressões são exercidas nos agregados de células e que ocorrem trocas gasosas entre o meio de cultura e o ar. Também as células podem ter acesso facilmente aos nutrientes do meio, ocorrendo um crescimento sincrônico das células na cultura.

CULTURA DE PROTOPLASTOS

Protoplastos são células vegetais sem parede celular. Eles podem ser isolados por tratamentos de tecidos vegetais, como, tecidos do mesófilo foliar, em solução de enzimas que degradem a parede celular, com estabilizadores osmóticos para preservar as estruturas e a viabilidade dos protoplastos. Esta técnica é uma ferramenta importante para cruzamentos (hibridação parassexual) entre plantas de locais distantes ou espécies não aparentadas, que nunca ocorrem na natureza, principalmente por causa de barreiras de incompatibilidade sexual.

CULTURA DE ANTERAS

Plantas haplóides são importantes no estudo de indução de mutações e

também na produção de plantas homozigotas. Com a introdução das técnicas para a indução de androgênese, que é o desenvolvimento de haplóides a partir da cultura de anteras excisadas, teve sucesso a produção de haplóides para programas de melhoramento.

O estágio de desenvolvimento das anteras é o fator essencial para a produção de haplóides. Cada planta tem um estágio especial de desenvolvimento, para que ocorra o crescimento dos haplóides. Após a esterilização superficial dos botões selecionados, as anteras são separadas de seus filamentos e colocadas em meio sólido. É impossível recomendar um meio geral para a cultura de anteras e são fatores importantes do genótipo, idade da antera e condições de crescimento das plantas doadoras. É importante determinar o número de cromossomos das plântulas formadas, porque pode ser considerável a variação do estudo de ploidia, dependendo do estágio de desenvolvimento que comanda a formação do embrióide. O número de cromossomos dos haplóides pode ser dobrado pela colchicina ou por técnicas de regeneração.²

CULTURA DE ÓRGÃOS

Cultura de órgãos na multiplicação de plantas *in vitro* utiliza como explante partes da planta doadora em que as células estão diferenciadas. A parte da planta a ser utilizada depende da finalidade da multiplicação e de características das espécies envolvidas. Partes sexuais da planta, como embriões (a) e sementes, (b), e partes assexuadas, como gemas e meristemas (c), podem ser usadas.

a) Embrião

Aborto do embrião pode ocorrer como resultado do insucesso do cruzamento interespecífico ou intergenérico em melhoramento de plantas, principalmente devido à falta de endosperma com desenvolvimento apropriado. Com a aplicação da cultura asséptica do embrião em meio nutritivo, podemos vencer esse problema. É possível o crescimento completo e o desenvolvimento da planta por dissecação asséptica do embrião, a partir da semente e sua transferência para o meio conveniente.

Monnier³, em 1978, formulou um meio baseado no MS com obtenção de uma taxa de sobrevivência alta. Foram aumentadas as concentrações dos íons K^+ e Ca^{++} e reduzidas as de NH_4^+ . Frequentemente, aminoácidos são adicionados ao meio, como hidrolizado de caseína, causando um aumento do embrião, especialmente quando este não se desenvolveu completamente ao tempo de inoculação, variando a sua sensibilidade de acordo com a espécie.

Esta técnica também proporciona uma excelente oportunidade para o estudo da morfogênese do embrião.

b) Semente

Técnicas da cultura *in vitro* são utilizadas para o crescimento total ou quase total das sementes em desenvolvimento quando algumas apresentam dificuldades na germinação ou crescimento natural, por causa, por exemplo, de barreiras de dormência, tamanho da semente, duração das sementes em combinações com alta perda de sementes durante a germinação tradicional e crescimento.

c) Meristema

Os meristemas apresentam um conjunto de células embrionais, que se dividem continuamente em sua fase ativa, produzindo células filhas não diferenciadas que vão dar origem a tecidos permanentes, podendo ser terminal ou intercalar. A aplicação desta técnica que apresenta células geneticamente estáveis é utilizada na eliminação de patógenos, especialmente vírus, em plantas com propagação vegetativa e no armazenamento a longo prazo de germoplasma através de criopreservação.

É importante o tamanho do explante que varia de 0,1 mm - 0,5 mm para não-carregar os vasos que são o meio de transporte dos vírus. As desvantagens de armazenar germoplasma em sementes são: deterioramento rápido por patógenos, alto grau de heterozigosidade e tempo de duração limitado que, através da criopreservação, isto é, do armazenamento e baixas temperaturas, poderão ser vencidos.

Sondahl e colaboradores ⁴ classificam as técnicas, segundo o tempo necessário para se alcançar o objetivo que se tem em vista:

a) Aplicações a curto prazo (3 anos)

- Propagação vegetativa
- Eliminação de doenças
- Transferência de germoplasma e armazenamento
- Germinação de embrião

b) Aplicações a médio prazo (3 a 8 anos)

- Resgate do embrião
- Fertilização *in vitro*
- Variação somoclonal
- Variação gametoclonal
- Cultura de anteras e produção de haplóides

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BEELEN, J. *Introductory course on in vitro culture*. Wageningen, The Netherlands. International agriculture centre, 1984. 84p.
2. JENSEN, C. J. *Chromosome doubling techniques in haploids*. Proceedings of the international symposium. Haploids in higher plants, advances and potential. Guelph, University of Guelph, 1974. p.153-90.
3. MONNIER, M. Culture in vitro de l'embryon medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* (15) 473-97, 1976.

4. SONDAHL, R. M. SHARP, N. R.; EVANS, D.A. *Biotechnology of cultivated crops*. Seminar on biotechnology the challenges ahead. Singapore, 1983. 16p.