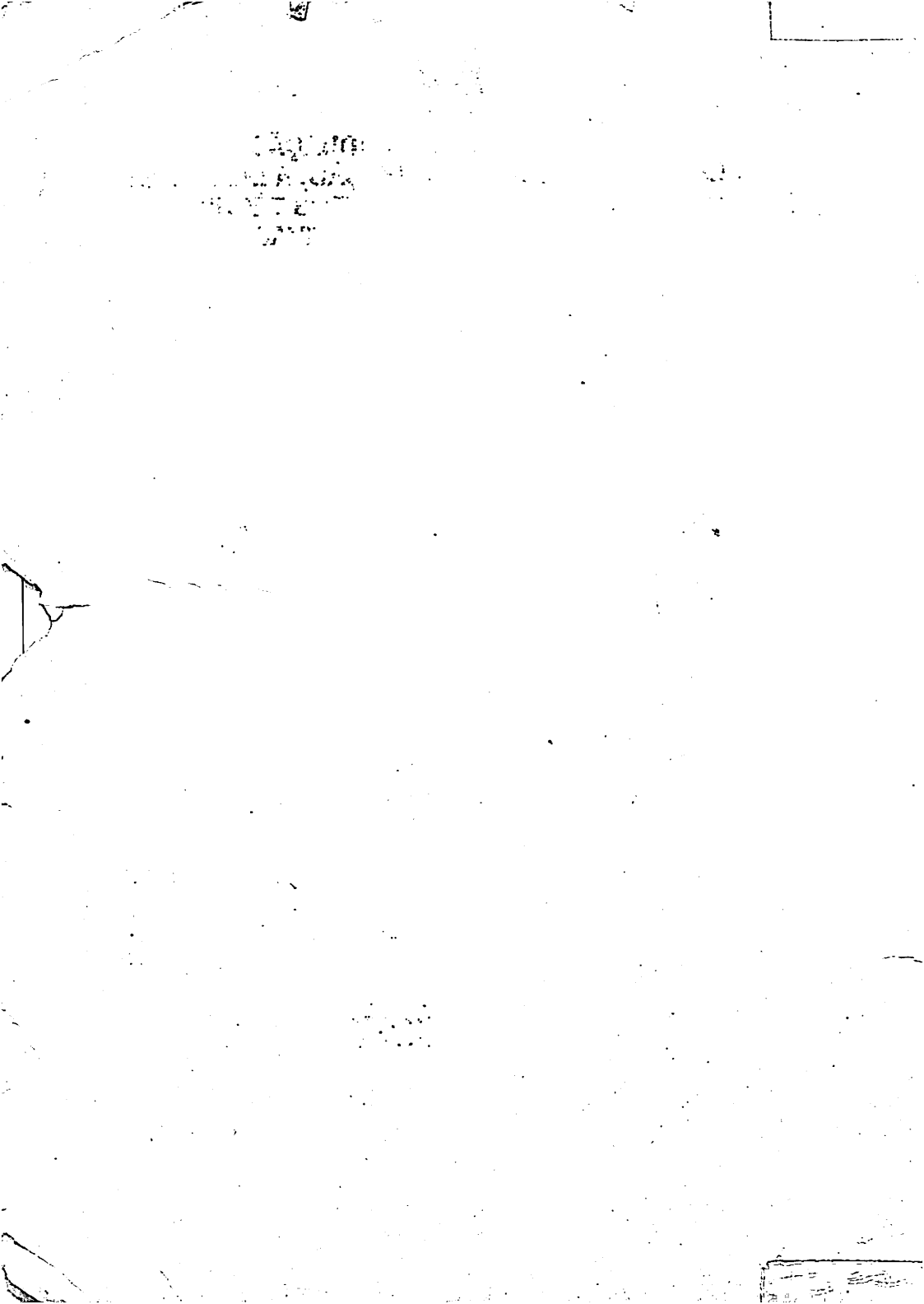




TEXTOS ACADÊMICOS

CULTURA DE TECIDOS

Renato Paiva
Patrícia Duarte de Oliveira Paiva



a
57331
049364

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO
"LATO SENSU" (ESPECIALIZAÇÃO) A DISTÂNCIA
BIOTECNOLOGIA: FUNDAMENTOS TÉCNICOS,
APLICAÇÕES E PERSPECTIVAS

CULTURA DE TECIDOS

Renato Paiva
Patrícia Duarte de Oliveira Paiva

BIBLIOTECA CENTRAL - UFLA



57331

BIBLIOTECA CENTRAL

FILE
N.º CLASSE 631.0523

PAI
Cul

N.º REGISTRO 57331
COTA 131 08 104

UFLA - Universidade Federal de Lavras
FAEPE - Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão
Lavras - MG

Parceria

UFLA - Universidade Federal de Lavras

FAEPE - Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão

Reitor

Fabiano Ribeiro do Vale

Vice-Reitor

Antônio Nazareno Guimarães Mendes

Diretor da Editora

Marco Antônio Rezende Alvarenga

Pró-Reitor de Pós-Graduação

Luiz Edson Mota de Oliveira

Coordenador de Pós-Graduação "Lato Sensu"

Antônio Ricardo Evangelista

Coordenador do Curso

Luciano Vilela Paiva

Presidente do Conselho Deliberativo da FAEPE

Antônio Eduardo Furtini Neto

Editoração

Centro de Editoração/FAEPE

Impressão

Gráfica Universitária/UFLA

**Ficha Catalográfica preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Paiva, Renato

Cultura de Tecidos / Renato Paiva, Patrícia Duarte de Oliveira
Paiva. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001.

97 p.: il. - Curso de Pós-Graduação "Lato Sensu"
Especialização a Distância: Biotecnologia: Fundamentos Técnicos,
Aplicações e Perspectivas.

Bibliografia

1. Cultura de tecido. 2. Laboratório. 3. Meio de cultura. 4.
Fotomorfogênese. 5. Propagação vegetativa. 6. Melhoramento
genético vegetal. I.: Paiva, P.D.O. II. Universidade Federal de
Lavras. III. Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão.
IV. Título.

CDD – 631.523

- 631.53

Nenhuma parte desta publicação pode ser reproduzida, por
qualquer meio ou forma, sem a prévia autorização.

SUMÁRIO

1. CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS	7
2. LABORATÓRIO DE CULTURA DE TECIDOS.....	9
2.1. INTRODUÇÃO	9
2.2. ESTRUTURA FÍSICA	10
2.2.1. Sala de limpeza.....	11
2.2.2. Sala de preparo	12
2.2.3. Sala de transferência	12
2.2.4. Sala de cultura ou sala de crescimento	12
2.2.5. Instalações de apoio	12
2.3. EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS.....	12
2.4. VIDRARIAS UTILIZADAS.....	18
3. MEIOS DE CULTURA.....	22
3.1. INTRODUÇÃO	22
3.2. COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA	22
3.2.1. Água.....	23
3.2.2. Nutrição mineral	23
3.2.3. Nutrição orgânica.....	25
3.2.4. Materiais de suporte	30
3.2.5. Qualidades físicas do meio de cultura	31
3.2.6. pH.....	31
3.2.7. Quantidade de meio.....	31
3.2.8. Condições de incubação.....	32
3.2.9. Esterilização do meio de cultura	34
4. TÉCNICAS DE ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i>	36
4.1. INTRODUÇÃO	36
4.2. CALOGÊNESE	36
4.2.1. Aplicação da cultura de calos	38
4.2.2. Técnicas para estabelecimento de calos.....	38
4.2.3. Tipos de calos.....	38
4.2.4. Tamanho, tempo de repicagem e manutenção de calos na subcultura.....	38

4.3. SUSPENSÃO CELULAR.....	39
4.3.1. Aplicações da suspensão celular.....	39
4.3.2. Métodos mais utilizados para medir o crescimento celular.....	39
4.3.3. Importância da curva de crescimento	41
4.4. CULTURA DE ANTERAS.....	41
4.4.1. Protocolo para a obtenção de haplóides	42
4.4.2. Fatores que influenciam a androgênese.....	42
4.4.3. Identificação de haplóides	43
4.4.4. Problemas	43
4.4.5. Utilização de plantas haplóides	43
4.5. CULTURA DE ESTRUTURAS ORGANIZADAS	44
4.5.1. Cultura de Meristemas	44
4.5.2. Cultura de Embriões	46
5. MULTIPLICAÇÃO.....	50
5.1. INTRODUÇÃO	50
5.2. FASES DA MICROPROPAGAÇÃO	51
5.2.1. Fase preparativa (Estádio 0).....	51
5.2.2. Início do cultivo (Estádio 1).....	52
5.2.3. Multiplicação (Estádio 2).....	53
5.2.4. Alongamento de brotações e indução de raiz (Estádio 3):	54
5.2.5. Transferência para as condições de casa de vegetação (Estádio 4):	55
5.3. PRODUÇÃO DE MUDAS LIVRES DE ENFERMIDADES	55
5.3.1. Termoterapia.....	55
5.3.2. Cultura de meristema.....	55
5.3.3. Termoterapia seguida de cultura de meristema.....	56
5.3.4. Microenxertia.....	56
6. ENRAIZAMENTO.....	58
6.1. INTRODUÇÃO	58
6.2. ENRAIZAMENTO IN VITRO.....	59
6.3. ENRAIZAMENTO EX VITRO.....	62
7. ACLIMATIZAÇÃO.....	64
7.1. INTRODUÇÃO	64
7.2. ESTRESSE HÍDRICO	64
7.3. FOTOSSÍNTESE	65

7.4. ABSORÇÃO DE NUTRIENTES	65
7.5. FITOSSANIDADE	66
7.6. CONDIÇÕES PARA A ACLIMATIZAÇÃO	66
8. FOTOMORFOGÊNESE <i>IN VITRO</i>.....	68
8.1. INTRODUÇÃO	68
8.2. LUZ E LÂMPADAS	68
8.3. RESPOSTAS DA PLANTA À LUZ	69
8.4. FOTOMORFOGÊNESE E CULTURA DE TECIDOS	69
8.4.1. Comprimento de onda.....	70
8.4.2. Intensidade de luz (irradiância).....	70
8.4.3. Comprimento do dia (fotoperíodo)	71
9. PROBLEMAS NO CULTIVO <i>IN VITRO</i>	72
9.1. INTRODUÇÃO	72
9.2. OXIDAÇÃO	72
9.3. DECLÍNIO NO VIGOR.....	74
9.3.1. Declínio na taxa de proliferação	74
9.3.2. Habituação.....	75
9.4. NECROSES.....	75
9.4.1. Necrose apical em brotações.....	75
9.4.2. Como evitar a necrose	76
9.5. VITRIFICAÇÃO (HIPERHIDRICIDADE).....	76
9.5.1. Ocorrência	77
9.5.2. Fatores que influenciam a vitrificação.....	77
9.5.3. Prevenção da vitrificação.....	78
10. PRINCIPAIS APLICAÇÕES DA CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS.....	80
10.1. INTRODUÇÃO.....	80
10.2. APLICAÇÕES DA CULTURA DE TECIDOS NA PROPAGAÇÃO ASSEXUADA	80
10.3. APLICAÇÕES EM FITOPATOLOGIA	81
10.4. APLICAÇÕES NO MELHORAMENTO GENÉTICO	81
11. ALGUNS CONCEITOS EM CULTURA DE TECIDOS.....	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

Renato Paiva¹

Patrícia Duarte de Oliveira Paiva²

O desenvolvimento de técnicas de cultura de tecidos tem sido, indubitavelmente, uma das contribuições mais significativas para as possibilidades de manipulação dos biológica. A cultura de tecidos é um processo através do qual pequenos fragmentos de tecido vivo (explantes) são isolados de um organismo e cultivados assepticamente por períodos indefinidos em um meio nutritivo semi-definido ou definido. Esta definição original deve ser, no entanto, ampliada no caso das plantas, para incluir toda uma gama de explantes como plântulas e órgãos (tais como culturas de óvulos ou de embriões), células isoladas e protoplastos. Tais avanços têm aumentado as perspectivas de operações possíveis de serem utilizadas, em diversos campos da biotecnologia de plantas.

Um marco importante nesta área ocorreu em 1958 através de dois grupos independentes de pesquisadores, os quais conseguiram induzir embriões somáticos a partir do calo de cenoura, com subsequente desenvolvimento de plantas. Nos anos seguintes, foi observado em outras espécies a capacidade de formar embriões somáticos *in vitro*.

Os fenômenos morfogênicos observados *in vitro* resultam da diferenciação, desdiferenciação ou rediferenciação do explante inicial e podem ser agrupados, conforme a sua natureza, de duas formas diferentes: morfogênese por via direta ou por via indireta. As técnicas por via indireta podem ser empregadas, quando são desejadas variações genéticas nos descendentes, em virtude da possibilidade de obtenção de variantes em células provenientes do calo. Em contrapartida, a técnica direta pode ser empregada quando se deseja manter a identidade genética do genótipo propagado.

¹ Professor Adjunto, PhD, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA)

² Professora Adjunto, Dra., Departamento de Agricultura, UFLA.

A utilização da cultura de tecidos para fins de propagação de plantas é comumente dividida nos seguintes estágios: estágio 0 (seleção e preparo da planta matriz), estágio 1 (estabelecimento de uma cultura asséptica), estágio 2 (produção de propágulos adequados), estágio 3 (preparação para o crescimento em meio natural) e estágio 4 (aclimatização).

Normalmente, explantes retirados de plantas jovens ou plântulas, apresentam melhores respostas de crescimento *in vitro* em relação a explantes obtidos de plantas adultas.

O desenvolvimento de células individuais em complexos órgãos e tecidos multicelulares é um processo comum a todas as formas superiores de vida. Isto significa que todo um espectro de desenvolvimento conhecido como diferenciação, se constitui em uma série de processos altamente coordenados e determinados geneticamente, através dos quais, gametas isolados ou fundidos (esporos e zigotos, respectivamente, em plantas) e primórdios somáticos derivados de células individuais se desenvolvem em plantas inteiras. As vias de diferenciação envolvidas na maturação da planta são, em última análise, determinadas pela natureza constitutiva dos genes herdados, sendo que a expressão dos mesmos é modulada por interações celulares e ambientais. Os padrões de desenvolvimento da planta são razoavelmente consistentes dentro de limites definíveis de genótipo, ou seja, grupos taxonômicos, de maneira que os constituintes genéticos da célula germinativa original teoricamente contêm todos os elementos determinantes dos padrões de diferenciação.

O conceito de totipotência surgiu baseado neste contexto. Os tecidos somáticos de uma planta são essencialmente os produtos de divisões mitóticas, sendo que cada célula dentro do organismo é capaz de regenerar novas réplicas do mesmo organismo, sob condições apropriadas. Por definição, totipotência é a capacidade de uma célula regenerar o fenótipo do organismo completo e diferenciado, do qual ela é derivada. Nas plantas, a maioria das divisões celulares coordenadas ocorrem em áreas concentradas conhecidas como meristemas os quais estão distribuídos em vários pontos do organismo, durante o seu desenvolvimento. O funcionamento dos meristemas pode ser ativado ou suprimido, de acordo com os padrões de diferenciação ditados por mecanismos de controles genético ou ambiental.

LABORATÓRIO DE CULTURA DE TECIDOS

Gustavo de Araújo Soares¹

Renato Paiva²

Patrícia Duarte de Oliveira Paiva³

José Ranieri Ferreira de Santana⁴

Édson José Artiaga de Santiago⁵

2.1. INTRODUÇÃO

As atividades em um laboratório de cultura de tecidos devem ser realizadas em um ambiente asséptico, com temperatura e iluminação controladas. Dependendo do tipo de trabalho que se pretende realizar, tanto a luz quanto a temperatura são fatores importantes, que podem alterar os resultados. Deste modo, a padronização das condições ambientais em um laboratório proporciona uma maior confiabilidade nos resultados obtidos e uma menor porcentagem de perda de material, já que estes fatores podem ser regulados para que se obtenha uma condição ótima, onde ocorre rápido crescimento e melhor desenvolvimento do material.

A assepsia é outro fator muito importante que deve ser considerado no trabalho de cultura de tecidos. Como o meio de cultura possui nutrientes essenciais para o crescimento de células, ele está sujeito a contaminação por fungos e bactérias presentes no ar, nos materiais utilizados nos procedimentos ou, até mesmo, no corpo da pessoa que está executando a inoculação. Geralmente esses microrganismos contaminantes proliferam mais rapidamente que o material de interesse, levando à morte do mesmo.

¹ Mestrando em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras (UFLA)

² Professor Adjunto, PhD, Departamento de Biologia, UFLA

³ Professora Adjunto, Dra., Departamento de Agricultura, UFLA

⁴ Professor Assistente, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)

⁵ Pesquisador, EMBRAPA Amazônia Oriental, Belém/PA.

Para evitar a contaminação é importante se ter no laboratório instalações com características apropriadas, trabalhar somente com equipamentos limpos e esterilizados e seguir normas de trabalho que possibilitem a criação de um ambiente com elevado nível de assepsia.

A compartimentalização das atividades dentro do laboratório é um dos cuidados que deve ser tomado para se evitar a contaminação. Atividades que lidam com material contaminado e sujo devem ser separadas das atividades com materiais esterilizados e que necessitam de ambiente asséptico. Assim, as atividades no laboratório devem seguir uma seqüência natural pelas instalações, de tal forma que procedimentos sucessivos sejam realizados lado a lado. Dessa forma, economiza-se tempo e trabalho, resultando também em economia financeira.

2.2. ESTRUTURA FÍSICA

Recomenda-se que as atividades dentro de um laboratório de cultura de tecidos vegetais sejam distribuídas em salas, na ordem em que forem realizadas. Assim, a sala de limpeza é o primeiro cômodo, destinado à limpeza e esterilização de materiais. Em seguida, vem a sala de preparo, onde todo material e soluções utilizadas e os meios de culturas são preparados.

Na sala de transferência, ocorre a manipulação asséptica e inoculação do tecido vegetal nos meios de cultura e na sala de cultura, todo material inoculado é incubado em condições ambientais controladas. As salas de preparo, transferência e cultura podem ficar juntas. A sala de transferência, por exigir condições extremamente assépticas, não pode ser dividida com nenhuma outra.

Existe basicamente duas maneiras de se distribuir o espaço físico do laboratório. Na primeira, as salas são dispostas de acordo com a seqüência de atividades em forma de um círculo imaginário. Assim, a última fase fica espacialmente próxima à primeira. Na segunda, as salas também são dispostas de acordo com a seqüência de atividades, porém em linha reta (Figura 1).

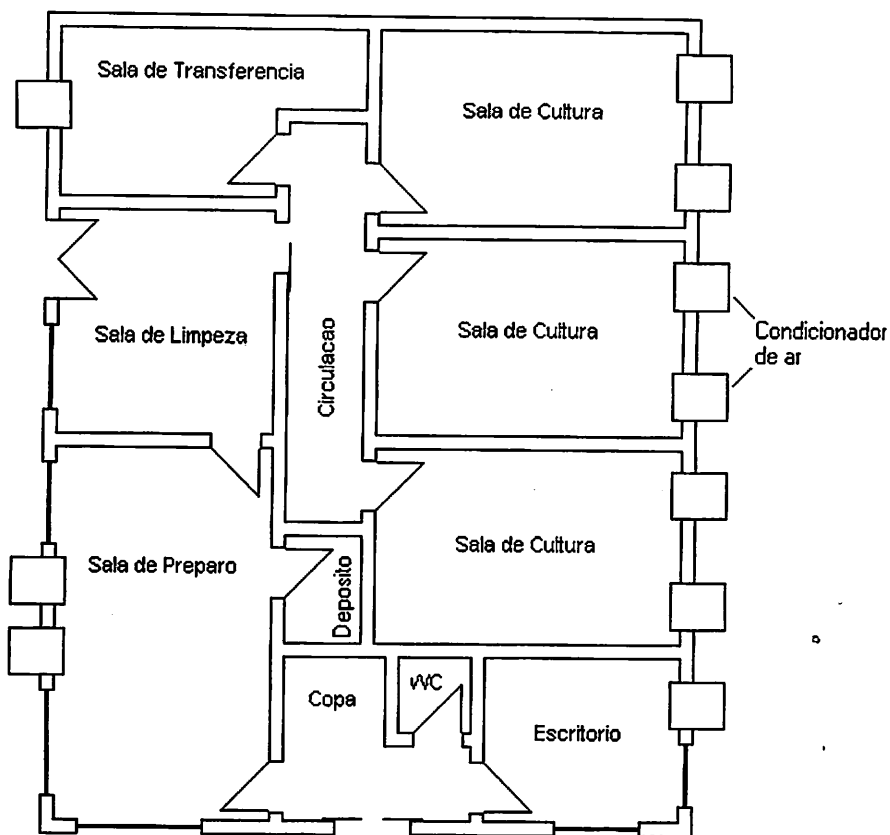


Figura 1: Exemplo de uma planta baixa de um laboratório de cultura de tecidos vegetais.

2.2.1. Sala de limpeza

É o local para descarte de meios de cultura, lavagem de vidraria, utensílios diversos e autoclavagem de água. Deve ser dotada de bancada, armários e prateleiras para estocagem de material, pias fundas, autoclave, destilador, deionizador, lavador de pipetas, forno de microondas, estufa de secagem de vidrarias, escorredor de vidrarias e eletricidade para 110 e 220 volts. A assepsia desta sala é baixa, devido as suas atividades. Por isso, recomenda-se que esta sala fique distante da sala de transferência.

2.2.2. Sala de preparo

Local para preparo de meios de cultura e de soluções. É a sala de maior circulação de pessoal, por ser onde se realizam as principais atividades do laboratório. Deve estar equipada com armários, estante para estocagem de vidraria, pia, geladeira, freezer, balança, peagâmetro, agitador magnético, autoclave e eletricidade para 110 e 220 volts.

2.2.3. Sala de transferência

Local onde se manipula asépticamente o material vegetal, sendo exclusivo para a capela de fluxo laminar e estantes que auxiliam na estocagem temporária dos meios de cultura e outros materiais já autoclavados, destinados ao uso imediato. A circulação de pessoas deve ser restrita, sendo que uma pequena janela de vidro na porta é interessante para visualização, evitando sua abertura freqüente por motivos diversos.

2.2.4. Sala de cultura ou sala de crescimento

Local destinado ao crescimento *in vitro* do material inoculado. Necessita de estantes com prateleiras (uma sugestão é que possuam 50 cm de largura, distanciadas entre si de 40-45 cm, num total de 5 prateleiras por estante). Cada prateleira deve ser iluminada individualmente por 2 fileiras de lâmpadas fluorescentes. Um armário ou um simples pano preto é útil, também, para as culturas que precisam se desenvolver no escuro.

2.2.5. Instalações de apoio

O último passo na cultura de tecidos vegetais é a aclimatização das plantas, ou seja, é a etapa na qual as plantas têm de se adaptar ao ambiente externo ao laboratório. Para isso, é necessário uma área externa, como câmara de nebulização ou telado apenas, onde as plantas terão um ambiente controlado e que pode ser modificado, para que o material vegetal se adapte vagarosamente ao ambiente natural.

2.3. EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS

- a) **Autoclave:** utilizada para esterilização de meios de cultura, vidraria, água e outros materiais. Este aparelho pode produzir calor seco ou calor úmido, que é mais eficiente para esterilização. A temperatura ideal de trabalho fica em 121°C. Pode ser horizontal ou vertical. Em laboratórios menores, pode ser substituída por painéis de pressão domésticas dotadas de manômetro (Figura 2).
-

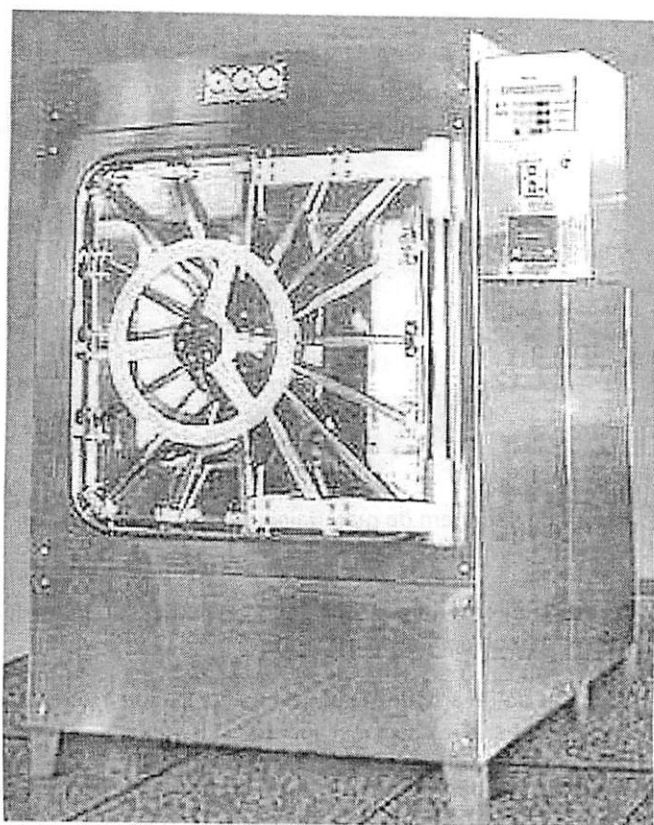


Figura 2: Autoclave horizontal.

- b) **Destilador:** utilizado para eliminação de sais minerais da água. Para uma maior pureza da água, recomenda-se sua utilização juntamente com o deionizador.
 - c) **Deionizador:** deve ser instalado logo após o destilador. Auxilia na eliminação de íons.
 - d) **Estufa de secagem:** destina-se a secagem de vidraria e outros materiais. Funciona como um forno elétrico comum, produzindo calor seco. Estes podem também ser utilizados para esterilização desde que produzam temperaturas de no mínimo 160°C (Figura 3).
-

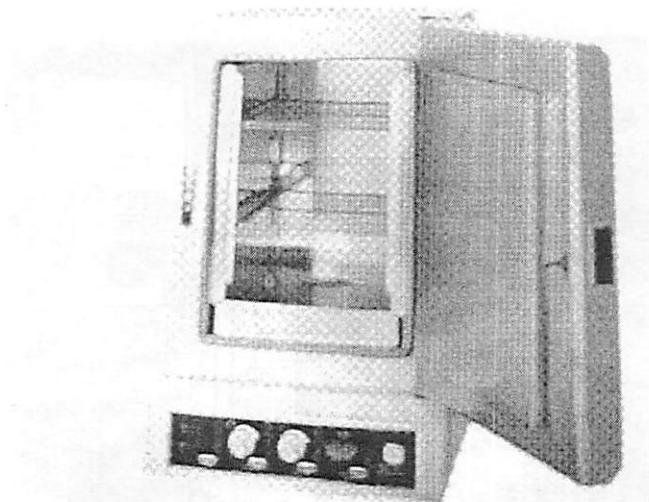


Figura 3: Estufa de secagem de materiais.

- e) **Forno de microondas:** usado para fusão de ágar. Este equipamento pode ser substituído por um ebulidor..
 - f) **Máquina de lavar vidraria:** Funciona como uma máquina de lavar pratos e é utilizada para lavagem mecânica de vidrarias.
 - g) **Aparelho de banho-maria:** substitui o forno de microondas para a fusão de ágar.
 - h) **Aquecedor de água:** utilizado para lavagem de frascos com meio de cultura.
 - i) **Lavador de pipetas:** destina-se à lavagem de pipetas.
 - j) **Geladeira:** armazenamento de soluções-estoque, reagentes e reguladores de crescimento.
 - k) **Freezer:** armazenamento de reagentes que necessitem temperaturas abaixo de zero graus centígrados.
 - l) **Balança:** imprescindível para pesagem de reagentes, no preparo de soluções e dos meios de cultura. Para quantidades menores há a
-

necessidade de uma balança de precisão. Um laboratório de cultura de tecidos vegetais, mesmo que pequeno, necessita de uma balança de precisão (Figura 4).

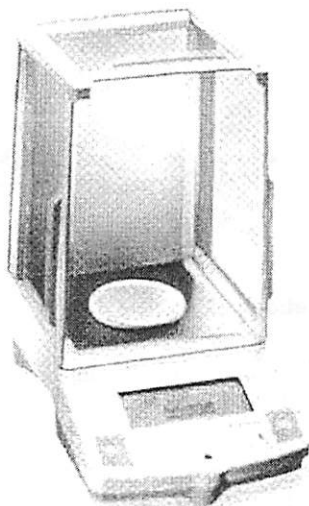


Figura 4: Balança analítica.

- m) **Medidor de pH:** extremamente útil na determinação do pH de soluções e dos meios de cultura. Pode ser substituído por papéis-indicadores, porém apresentam menor precisão (Figura 5).

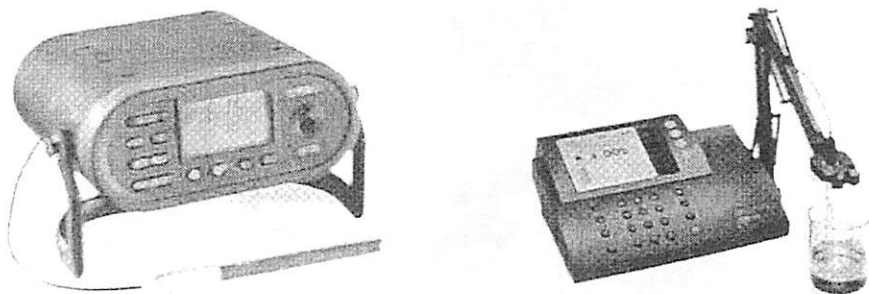


Figura 5: Medidor de pH.

- n) **Agitador magnético:** auxilia no processo de dissolução de reagentes (Figura 6).



Figura 6: Agitador magnético.

- o) **Capela de fluxo laminar:** utilizada para realizar trabalhos de manipulação asséptica. Funciona forçando a passagem de ar por meio de um filtro bacteriológico, de modo que seja criado um ambiente estéril no interior da capela. Não deve ser colocada em frente de porta, ventilador ou aparelho de ar condicionado, para evitar entrada de ar contaminado durante o uso. Algumas capelas possuem lâmpadas ultravioleta, que, ligadas cerca de 20 minutos antes de se iniciar o trabalho, esterilizam o ambiente (Figura 7).



Figura 7: Capela de fluxo laminar.

- p) **Dispensador de meios de cultura:** bomba aspirante que auxilia na distribuição do meio de cultura nos frascos, de uma só vez, no volume desejado. É muito útil quando se trabalha com grandes quantidades de meio de cultura, aumentando o rendimento da operação.
- q) **Bico-de-bunsen:** equipamento essencial no interior da capela de fluxo laminar, pois esteriliza os instrumentos cirúrgicos (pinças e bisturis) utilizados e a boca dos frascos. Produz uma chama de fogo pela queima de gás. Pode ser substituído por lamparina a álcool (Figura 8).

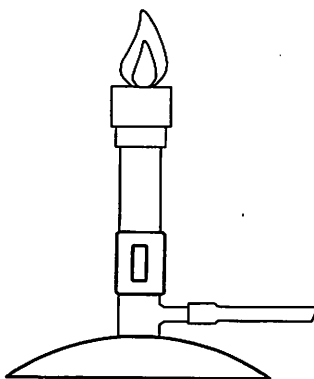


Figura 8: Aspecto visual de um bico-de-bunsen.

- r) **Microscópio estereoscópio:** muito utilizado em laboratórios que realizam limpeza clonal.
- s) **Desumidificador ou umidificador:** aparelhos utilizados para controlar a umidade relativa do ar dentro do laboratório, diminuindo-a ou aumentando-a respectivamente.
- t) **Agitador orbital:** necessário para cultivos em meios líquidos que necessitem ficar sob agitação constante.
- u) **Esterilizadores de ar:** reduz a população de microorganismos nos ambientes.
- v) **Máquina para lavagem de vidrarias.**
-

2.4. VIDRARIAS UTILIZADAS

Além dos equipamentos e da infra-estrutura citada acima, outros utensílios como vidrarias e materiais são muito utilizados dentro de um laboratório de cultura de tecidos vegetais.

Os frascos para o cultivo *in vitro* são essenciais para a manutenção das condições assépticas do ambiente. Esses frascos têm que ser transparentes e autoclaváveis, de vidro ou plástico. Podem ser utilizados desde tubos de ensaio e frascos próprios para a cultura de tecidos (250 a 500 mL) até frascos de alimento e conserva, reutilizados, de tamanhos e formatos variados. É importante que os frascos possuam tampas que permitam trocas gasosas entre o ambiente interno e o externo ao tubo de ensaio. Porém, deve-se certificar de que as tampas não permitam a contaminação do meio nutritivo (Figura 9).

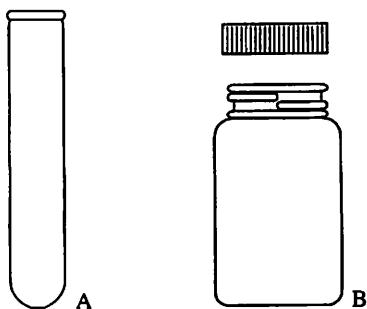


Figura 9: Aspecto visual de um tubo de ensaio (A) e um frasco de vidro (B) para cultivo *in vitro*.

Para o preparo das soluções, são utilizados beakers, erlenmeyers, provetas, buretas, pipetas, placas de Petri e bastões de vidro. É aconselhável que se tenha beakers e erlenmeyers com capacidade variando entre 25 a 2000 mL e provetas de 10 a 1000 mL (Figura 10).

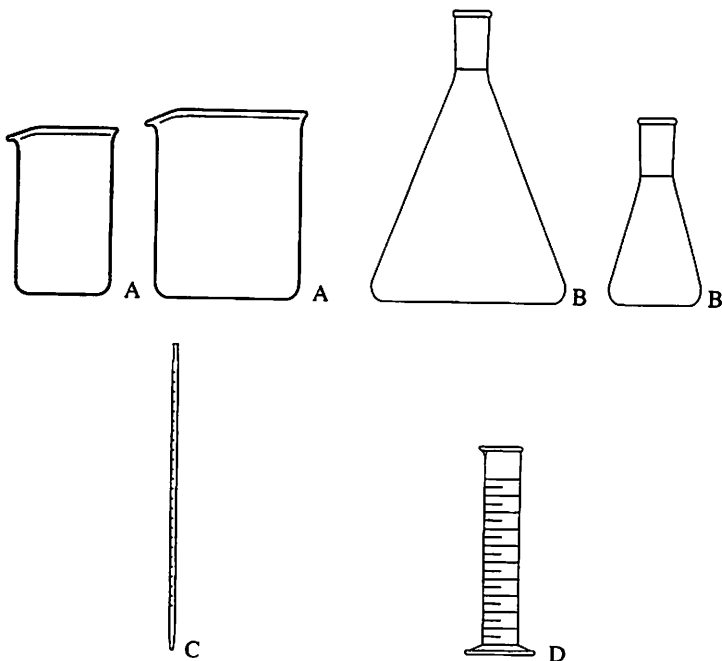


Figura 10: Aspecto visual de beakers (A), erlenmeyers (B), pipeta (C) e proveta (D).

As buretas são usadas para despejar o meio nutritivo nos recipientes de cultura, porém laboratórios maiores utilizam dispensadores automáticos de meio de cultura para este fim (Figura 11).



Figura 11: Aspecto visual de uma bureta.

As pipetas graduadas e as provetas são usadas para medições mais precisas de volumes. O laboratório deve dispor de um bom número de pipetas de 1, 2, 5, 10 e 25 mL. Existem ainda as pipetas automáticas, que, apesar de mais caras, facilitam e agilizam o trabalho. Depois do preparo das soluções-estoque, estas devem ser guardadas em frascos de vidro de capacidade de 250 a 500 mL, de boca estreita e de cor âmbar para os reagentes sensíveis à luz (Figura 12).



Figura 12: Aspecto visual de frascos de vidro para armazenamento de soluções.

Para facilitar o manuseio e o trabalho com os tubos de ensaio, utiliza-se um suporte, geralmente de plástico autoclavável, onde os tubos de ensaio são mantidos em posição inclinada de 45°, para aproveitarem a melhor luz na sala de cultura. Ainda na sala de cultura, termômetros de máxima e mínima são indispensáveis para o eficaz controle da temperatura neste ambiente.

Bandejas de material autoclavável, funil, papel-toalha, algodão, papel alumínio, filmes plásticos, pinças, bisturis com lâminas, etiquetas, vasos para plantas, sacos plásticos de mudas, detergentes e caixas gerbox para aclimatização são apenas mais alguns utensílios usados em um laboratório de cultura de tecidos vegetais.

MEIOS DE CULTURA

*Edson José Artiaga de Santiago*¹

*Renato Paiva*²

*Patrícia Duarte de Oliveira Paiva*³

*José Raniere Ferreira de Santana*⁴

*Guilherme Augusto Canela Gomes*⁵

3.1. INTRODUÇÃO

Os meios nutritivos fornecem as substâncias essenciais para o desenvolvimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão do desenvolvimento *in vitro*. A constituição do meio é baseada nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender em necessidades específicas.

Um dos primeiros meios de cultura desenvolvidos foi o de White. Esse meio apresenta baixo nível de nitrogênio e de potássio, restringindo assim o seu uso para muitas células; entretanto, esta formulação baixa em sais, é usada em muitas situações. O meio MS foi uma das primeiras formulações melhoradas usadas em cultura de tecidos de plantas, apresentando altos níveis de nitrato, potássio e amônio. Atualmente é o meio de cultura amplamente utilizado em trabalhos de cultura de tecidos vegetais.

3.2. COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

Os meios nutritivos são formados de múltiplos componentes, sendo bastante variáveis em função da espécie vegetal e da origem do explante.

¹ Pesquisador, EMBRAPA Amazônia Oriental, Belém/PA

² Professor Adjunto, PhD, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA)

³ Professora Adjunto, Dra., Departamento de Agricultura, UFLA

⁴ Professor Assistente, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)

⁵ Doutorando em Fitotecnia, Departamento de Agricultura, UFLA.

O meio de cultura é constituído de componentes essenciais e opcionais. Os essenciais compreendem a água, os sais inorgânicos, a fonte de carbono e energia, vitaminas e substâncias reguladoras de crescimento. Entre os componentes adicionais estão incluídos os aminoácidos e amidas, ácidos orgânicos e substâncias naturais complexas. Os componentes básicos do meio nutritivo o fazem um substrato excelente para o crescimento de bactérias e fungos. Para evitar a contaminação dos meios por impurezas minerais, todos os sais utilizados na sua preparação devem ser de qualidade analítica ("p.a"). A inclusão de fungicidas e bactericidas no meio não é aconselhável, podendo ter efeito tóxico para o explante.

Os principais componentes de uso mais freqüente nos meios de cultura são:

3.2.1. Água

A qualidade da água é muito importante em cultura de tecidos vegetais, uma vez que este é o componente que entra em maior proporção na preparação do meio. Para melhor controle deve-se usar água destilada, bidestilada e deionizada. A utilização de água de torneira pode comprometer o desenvolvimento da cultura.

3.2.2. Nutrição mineral

Os nutrientes empregados nos meios de cultura são os mesmo estabelecidos para a nutrição mineral básica das plantas no campo. São eles:

a) **Nitrogênio** é um dos nutrientes mais estudados da constituição dos meios de cultura, pois pode ser suplementado na forma de amônio (cátion) ou nitrato, nitrato (ânion), ou ainda na forma de compostos orgânicos, dependendo do material em cultura. É constituinte de aminoácidos, nucleotídeos e coenzimas, tendo importância na síntese protéica. Meios enriquecidos com nitrogênio é fundamental para a indução de embriogênese somática, bem como diferenciação de parte aérea.

b) **Fósforo** é adicionado ao meio, principalmente, como fosfato de potássio monobásico (H_2PO_4). É absorvido pelas plantas na forma de íons $H_2PO_4^-$. Desempenha papel importante no metabolismo energético, na regulação de processos enzimáticos e na ativação de enzimas. Necessário para a síntese do ATP; na organogênese está envolvido na diferenciação da parte aérea, pois reverte o efeito das auxinas.

c) **Potássio** é usado na forma de nitrato, fosfato ou cloreto. Ativador de várias enzimas do metabolismo de carboidratos e proteínas. Uma das mais importantes é a quinase do piruvato, enzima envolvida nos processos de glicólise e respiração. É necessário para a embriogênese somática. Esta necessidade é distinta daquela para o crescimento de células. Enquanto que 1mM é suficiente para proliferação celular, uma concentração de 20mM é utilizada para a produção ótima de embriões somáticos em cenoura. A deficiência no meio de cultura conduz, segundo alguns autores, a hiperhidricidade e decréscimo na taxa de absorção de fosfato.

d) **Enxofre** é incorporado ao meio, principalmente, na forma de sulfato, outra possibilidade é na forma de aminoácidos (cistina, cisteína e metionina). Envolvido no metabolismo energético na formação do fosfosulfato de adenosina, constituinte da tiamina, biotina e coenzima A. Sua absorção é relacionada à assimilação do nitrogênio e, independentemente do pH.

e) **Cálcio** é adicionado, principalmente, na forma de cloreto ou nitrato. Possui papel importante no metabolismo da planta. Envolvido na divisão celular, uma vez que um dos componentes da lamela média é o pectato de cálcio, mantém a integridade da membrana celular e é importante para a germinação de grãos de pólen. É um agente quimiotrófico para o direcionamento do tubo polínico. Altas concentrações de cálcio (6 a 9 mM) são necessárias para controle da necrose do ápice caulinar.

f) **Magnésio** é mais usado na forma de sulfato de magnésio. É um dos componentes da clorofila; co-fator importante para várias reações enzimáticas que atuam sobre substratos fosforilados.

g) **Hidrogênio** exerce papel importante no metabolismo da planta. Com exceção do CO₂, todos os compostos orgânicos têm hidrogênio. Na sua forma oxidada é um próton.

h) **Carbono** forma o esqueleto de todos os compostos orgânicos.

i) **Oxigênio** é similar ao carbono, também um dos componentes de todos os compostos orgânicos do organismo vivo: carboidratos, lipídios, ácidos nucleicos, produtos naturais. O papel do oxigênio livre é receptor de elétrons na respiração.

j) **Ferro** é adicionado na forma de Fe-EDTA. Envolvido nas reações de oxirredução nos organismos vivos. Há muitos metabólitos contendo ferro. Essencial para a síntese da clorofila, é integrante do grupo protéico (heme) das porfirinas.

k) **Boro** é usado na forma de ácido bórico. Envolvido no metabolismo de carboidratos e ácidos nucleicos. Importante na germinação de grãos de pólen e crescimento do tubo polínico.

l) **Molibidênio** é adicionado na forma de molibdato de sódio (Na₂MoO₄). Co-fator da redutase do nitrato.

m) **Cobre** é usado como sulfato de cobre. Constituinte da enzima plastocianina que é importante componente do transporte de elétrons.

n) **Cloro** é essencial para a fotossíntese, sendo requerido durante a reação de Hill.

o) **Zinco** é usado como sulfato de zinco. Importante nas reações de oxirredução das plantas. Co-fator de enzimas anidrase carbônica.

p) **Manganês** é adicionado como sulfato de manganês. Essencial para a reação de Hill na fotossíntese, quando a molécula de água é quebrada produzindo elétrons e oxigênio.

q) **Cobalto** é usado como cloreto de cobalto e está envolvido na expansão foliar.

3.2.3. Nutrição orgânica

Os compostos orgânicos importantes são os carboidratos, substâncias reguladoras de crescimento, vitaminas, aminoácidos e amidas, certas purinas e pirimidinas, hexitóis e ácidos orgânicos.

a) Fonte de carbono e energia

Ao se excisar parte da planta e cultivá-la *in vitro*, as células não são fotossinteticamente ativas e necessitam de carboidratos para crescimento e desenvolvimento. A escolha de determinado açúcar depende do processo em questão. Muitas vezes, açúcares que são inefetivos na manutenção do crescimento do calo, sustentam a iniciação de brotações adventícias e a embriogênese somática.

Os carboidratos mais usados são a sacarose, glicose e frutose nos níveis de 2 a 5% (p/p). A concentração de 3% é a mais usada. Concentrações de sacarose entre 6 a 12% podem ser usadas em determinadas situações, por exemplo, em cultura de embriões, frutos e anteras, enquanto que o nível de 1,5% é usado em cultura de protoplastos.

O açúcar pode caramelizar se o tempo de autoclavagem for excessivo, formando em sua degradação hidroxiacetonas, dihidroxiacetona, furano, 2-metilfurano, 2,5-dimetilfurano e maltol. Estes compostos formam meladoidinas que são compostos de coloração amarronzada, de alto peso molecular, podendo inibir o crescimento celular. O açúcar é purificado com acetato, para precipitar impurezas e pode conter alto nível de zinco que é tóxico para o tecido.

Glicose e frutose devem ser esterilizadas a frio.

b) Substâncias reguladoras de crescimento

O controle químico da diferenciação da parte aérea foi primeiramente observado em cultura de calo de *Nicotiana*. Foi observado, inibição na formação de gemas por auxinas, e reversão deste efeito estimulando brotações utilizando-se adenina bem como o fosfato inorgânico. Esta foi a constatação de que o processo de organogênese *in vitro* é controlado por substâncias hormonais sendo que o desenvolvimento de parte aérea, raiz ou calo é determinado pelo balanço entre auxinas e citocininas.

Concentrações relativamente altas de auxina e baixas de citocinina favorecem o enraizamento e o balanço inverso promove a formação de parte aérea. No entanto, concentrações iguais promovem a produção de calos. Por esta razão as auxinas e citocininas são componentes importantes no controle da morfogênese *in vitro*.

As concentrações das auxinas nos meios variam de 0,01 a 10 mg/L. As auxinas mais usadas são AIA (ácido indol-3-acético), AIB (ácido indol-3-butírico), ANA, 2,4-D, 2,4,5-T, 4-CPA e picloran. A auxina 2,4-D é bastante usada para a indução de calos *in vitro* e tem o efeito de supressão da morfogênese. O 4-CPA é uma das auxinas menos tóxicas para o tecido e, talvez, a que tenha o efeito menos detrimental na morfogênese. A auxina 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) e o picloran induzem a formação de calos em monocotiledôneas. As auxinas são termo-estáveis, não decompondo quando autoclavadas. O AIA é a auxina natural e a menos estável, sendo destruído em pH baixo. As auxinas 2,4-D e ANA são sintéticas e têm efeitos semelhantes às auxinas de ocorrências naturais, sendo mais estáveis à degradação. As soluções estoque de AIA não devem ser usadas após uma semana de seu preparo, enquanto soluções estoque de 2,4-D e ANA podem ser armazenadas até 12 meses sem ocorrer decomposição.

A dissolução das auxinas é feita em NaOH 1N. Utiliza-se 0,3 mL desta base para dissolver 10 mg de auxina (3 gotas dessa base, em pipeta Pasteur).

/ As citocininas são derivadas da adenina (aminopurina) e têm um papel fundamental na diferenciação e regeneração de plantas na maioria das espécies. Induzem a divisão celular, proliferação e morfogênese da parte aérea. As citocininas mais usadas em cultura de tecidos são a cinetina (CIN), benziladenina (BA), zeatina (Zea), isopentenil adenina (2ip) e thidiazuron (TDZ). As concentrações recomendadas destas substâncias variam de 0,03 a 30 mg/L. Cinetina, zeatina e isopenteniladenina são considerados termo-estáveis, uma vez que nenhum produto de sua decomposição foi observado após sua autoclavagem a 120°C, durante 1 hora. A benziladenina permanece estável quando autoclavada a 110°C, durante 20 minutos, mas a degradação fotoquímica pode ocorrer.

A dissolução das citocininas é feita em HCl 1N, levemente aquecido. Utiliza-se 0,3 mL deste ácido para dissolver 10 mg de citocinina.

/ O ácido gibelérico (GA₃) é usado, algumas vezes, em cultura de meristemas, na recuperação de plantas livres de vírus. O GA₃ deve ser dissolvido em água com pH ajustado a 5,7 ou em base (NaOH 1N). As soluções de GA₃ devem ser esterilizadas em filtro bacteriológico uma vez que esta substância se decompõe por autoclavagem. As soluções estoques devem ser preparadas na hora.

/ O ácido abscísico (ABA) é um fitormônio envolvido no processo de dormência e abscisão de folhas e frutos. Na cultura de tecidos o papel deste composto ainda não está bem definido, embora tenha efeito na embriogênese somática. Embora este composto seja termo-estável e fotossensível, recomenda-se sua esterilização a frio. O ABA é dissolvido em água ou base.

Os hormônios e as substâncias reguladoras de crescimento não devem ser dissolvidas em álcool, pois este produto tem efeito inibidor na morfogênese.

A relação de hormônios e substâncias reguladoras de crescimento mais comumente usados em cultura de tecidos são observados na Tabela 1.

Tabela 1: Hormônios e reguladores de crescimento mais utilizados em cultura de tecidos.

AUXINAS	ABREVIATURA	PESO MOLECULAR
Ácido Indol-3-acético	AIA	175,2
Ácido Indol-3-butírico	AIB	203,23
Ácido naftalenoacético	ANA	186,2
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	2,4-D	221,04
Ácido 4-clorofenoxiacético	4-CPA	184,5
Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico	Picloram	241,46
Ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético	2,4,5-T	255,49
Ácido-naftoxiacético	NOA	202,21
CITOCININAS		
6-Furfurilaminopurina ou Cinetina	CIN	215,2
6-Benzilaminopurina ou 6-benziladenina	BA, BAP	225,2
N ⁶ -(4-hidroxi-3-metilbut-2enil) aminopurina ou zeatina	ZEA	219,2
(6-benzilamino)-9-(2-tetrahidrooiranil) 9H-purina	PBA	300
N ⁶ -3-dimetil-2-butilaminopurina ou Isopenteniladenina	2ip	203,3
Thidiazuron (1-fenil-3-(1,2,3-thiadi-azol-5yl)) uréia	TDZ	220,2
GIBERELINAS		
Ácido giberélico	GA ₃	346,4
OUTROS		
Ácido 2-(cloroetil) fosfônico ou Ethephon ou Ethrel	CEPA	144,5
Ácido abscísico	ABA	264,31

c) Vitaminas

Vitaminas são compostos orgânicos que, em baixas concentrações, desempenham funções reguladoras catalíticas no metabolismo celular. A maioria das plantas superiores são capazes de sintetizar a totalidade das vitaminas necessárias para seu crescimento normal, embora os animais não apresentem esta propriedade.

A vitamina mais comumente usada em cultura de tecidos é a tiamina (B₁). A tiamina é solúvel em água. Outras vitaminas utilizadas incluem ácido nicotínico (B₃) e

piridoxina (B₆). Embora as vitaminas sejam adicionadas ao meio antes da autoclavagem, a esterilização a frio é recomendada para estudos específicos dessas substâncias.

O estudo dos efeitos das vitaminas em plantas é dificultado uma vez que muitas destas são produzidas pelos vegetais. (Nos animais, basta eliminar a vitamina da dieta para observar seu efeito).

- Vitamina A: ainda não foi encontrada nas plantas.
- Tiamina (Vit. B₁): sua importância no metabolismo celular é devido à função como coenzima na descarboxilação dos cetoácidos. Ex: Piruvato e cetoglutarato.
- Riboflavina (Vit. B₂): Constituinte da coenzima FMN (Flavina mononucleotídeo) e o FAD (Flavina-adenina-dinucleotídeo) que atuam em oxidações biológicas. Na fotossíntese FMN participa do transporte de elétrons.
- Ácido nicotínico (Niacina ou Vitamina B₃): É um componente das coenzimas NAD e NADP importantes na transferência de hidrogênio.
- Piridoxina, Piridoxal e Piridoxamina (complexo vit. B₆): Fazem parte do piridoxalfosfato, coenzima importante no metabolismo de aminoácidos. Estas vitaminas têm papel importante nas reações de transaminação e descarboxilação.
- Ácido pantotênico: Não é encontrado na sua forma livre. É um dos componentes da coenzima A e exerce papel importante no metabolismo de lipídios. Esta substância deve ser dissolvida em hidróxido de cálcio.
- Biotina: influência no metabolismo do ácido aspártico, especialmente, nas reações do ciclo de Krebs que levam à formação do ácido.
- Ácido ascórbico (vitamina C): Catalisador de fosforilação fotossintética devido ao poder de oxidar e reduzir facilmente.

d) Aminoácidos e amidas

Os aminoácidos e amidas têm importância na amplificação das respostas morfogênicas, proporcionando maior crescimento e facilitando a diferenciação no sentido da regeneração. A necessidade de sua suplementação pode ser determinada pela inclusão de uma proteína hidrolisada ao meio. Qualquer efeito benéfico pode ser avaliado pela substituição desta proteína por uma mistura de aminoácidos e amidas. As formas "L" dos aminoácidos são de ocorrência natural.

A L-tirosina apresenta influência na iniciação de parte aérea em cultura de calos, L-arginina no enraizamento e L-serina na obtenção de embriões haplóides mediante o cultivo de micróspero.

As amidas L-glutamina e L-arpagarina são benéficas na obtenção de embriões somáticos, e a cisteína é incluída, às vezes, como agente redutor.

e) Outros suplementos orgânicos

- Hexitóis:

O mais usado é o inositol, myo-inositol é a forma inativa e i-inositol é a ativa. O meso-inositol é uma mistura das formas d e l. O inositol é considerado estimulador de processos de crescimento *in vitro* e pode servir como fonte de carboidrato. Desempenha papel importante na biossíntese do ciclitol, no armazenamento de compostos polihídricos como reserva, na germinação de sementes, no transporte de açúcar, na nutrição mineral, no metabolismo de carboidratos, na estrutura de membranas, formação de parede celular, homeostase de hormônios e no estresse fisiológico.

- Purinas e Pirimidinas:

A adenina ou o sulfato de adenina estimulam o crescimento de brotações *in vitro*. A concentração mais usada varia de 40 a 160 mg/L.

As bases nitrogenadas citosina e guanina podem também promover o crescimento de cultura de calo.

- Ácidos orgânicos:

A adição de ácidos de compostos intermediários do ciclo de Krebs, tais como malato ou citrato, é comum em meio destinado à cultura de protoplasto. Estes compostos parecem estar envolvidos na minimização do efeito inibidor da amônia. A concentração de até 10 mM de sais de potássio é recomendada.

O ácido ascórbico e o ácido cítrico são usados para prevenir o escurecimento de tecidos excisados de plantas. As soluções antioxidantes são preparadas usando uma mistura de 100 mg de ácido ascórbico e 150 mg de ácido cítrico, dissolvido em 1 litro de água. Esta solução não deve ser autoclavada e sua esterilização é feita em filtro bacteriológico de 0,22 ou 0,45 micras.

A inclusão de 2000 mg/L de ácido ascórbico estimula o crescimento de calo.

- Compostos fenólicos:

Muitos derivados fenólicos (mono-OH) promovem o desenvolvimento da parte aérea enquanto que os derivados fenólicos (bi-OH) estão envolvidos com a iniciação de raízes. Estas substâncias atuam na degradação oxidativa do AIA. Por outro lado, compostos fenólicos (bi-OH) inibem a degradação oxidativa do AIA, tendo efeito benéfico no enraizamento.

- Extratos naturais:

São preparações obtidas de produtos naturais, de composição indefinida, que servem para enriquecer o meio de cultivo. São fontes de fatores, até então desconhecidos, que estimulam o crescimento *in vitro*. A inclusão destes extratos em meio de cultura só é feita, em último caso, quando as tentativas de adequação não forem suficientes para promover determinado processo morfogênético. Em trabalhos de rotina, estas preparações podem ser usadas caso estimulem respostas desejadas.

- *Leite de coco*: É o endosperma de *Cocos nucifera* na fase gelatinosa. É um suplemento bastante usado. Recomenda-se que seja esterilizado a frio.
- *Suco de laranja, tomate e outros*: O suco de laranja contém ácido cítrico e outras substâncias de crescimento não identificadas. Pode-se usar suco de laranja fresco ou congelado.
- *Polpa de Banana*: Tem sido usada na suplementação do meio de cultura de orquídeas. O seu efeito depende da cultivar e da quantidade, bem como, se originará de frutos verdes ou maduros.
- *Extrato de leveduras*: É extraído com álcool, contendo em sua composição produtos solúveis neste solvente. É fonte de aminoácidos e vitaminas.
- *Proteínas hidrolisadas*: Também são fontes de aminoácidos. Dentre estas, incluem: caseína hidrolisada; lacto-albumina hidrolisada, triptona, peptona, etc. Proteína de digestão enzimática tais como a K-Z-amina Tipo A é recomendada, em virtude dos aminoácidos se manterem intactos. A hidrólise ácida destrói os aminoácidos.

3.2.4. Materiais de suporte

a) Ágar

Ágar é um polissacarídeo obtido pela purificação de algas marinhas. O ágar deve ser de boa qualidade, por exemplo, TC agar, ou Taiyo agar. A concentração usada varia de 0,6% a 1% (de 6 a 10 g/L). O ágar impuro é constituído de polissacarídeos, aminoácidos, sais, açúcar, etc., devendo ser lavado em água destilada antes de ser usado. O ágar é alcalino, líquido à temperatura de 80°C e se solidifica à 40°C.

Outros produtos gelificantes são Gelrite (Calbiochem) e Phytigel (Sigma). São mais puros que o ágar e provenientes de fermentações bacterianas. Usados na concentração de 0,2% (2 g/L). Citam-se que estes produtos podem causar vitrificação em algumas espécies.

Alguns laboratórios sugerem o uso de polvilho de mandioca ou de milho (maizena) como gelificantes.

b) Carvão ativado

É um pó bastante fino e de cor escura. É utilizado para eliminar substâncias tóxicas produzidas pelo explante *in vitro*. A concentração é em torno de 0,3%. É usado quando ocorre o escurecimento do tecido *in vitro*, descoloração de meio de cultura, formação de calo na fase de enraizamento de propágulos, ou quando o crescimento do tecido é inibido. O carvão adsorve produtos provenientes do metabolismo, bem como substâncias hormonais e vitaminas. Sugere-se, em alguns casos, aumento da concentração de auxina, quando na presença de carvão ativado. A pureza deste produto é variável.

c) Outros produtos: Poliacrilamida, sílica gel e papel de filtro.

3.2.5. Qualidades físicas do meio de cultura

As qualidades físicas do meio de cultura, à semelhança da composição química, podem desempenhar um papel importante no sucesso ou falha do estabelecimento da cultura *in vitro*. Há espécies cujos explantes se desenvolvem melhor em meio líquido (gemas de bromeliáceas, ápices caulinares de batata e batata-doce); outras em meio sólido (ápices caulinares de alho, embriões de tomate, diferenciação de brotações em cotilédones de alface e tomate) e, um terceiro grupo que responde melhor em meio líquido com suporte de papel de filtro (ovários de tomate, morango e fumo).

Na utilização de meio sólido, deve-se considerar a concentração e pureza do agente gelificante.

3.2.6. pH

O crescimento do tecido *in vitro* é melhor em torno de pH 5,0. Recomenda-se este valor para formulações líquidas. Em meios gelificados com ágar, o pH deve ser ajustado em 5,7, pois em pH 5,0, ocorre a hidrólise de polissacarídeos, enquanto que em pH 6,0-6,2 verifica-se a precipitação de sais.

No ajustamento de pH, lava-se primeiramente o eletrodo e, em seguida, faz-se a leitura em tampão 4,0. Posteriormente lava-se o eletrodo e desta maneira o potenciômetro estará calibrado para uso.

O pH varia durante o período de incubação.

3.2.7. Quantidade de meio

Como regra geral, quanto menor o explante, menor a quantidade de meio a ser utilizado. Para ápices caulinares de batata e batata-doce, 4 mL de meio líquido são suficientes para a diferenciação e crescimento inicial, entretanto, em culturas estabelecidas, a taxa de crescimento é diretamente proporcional à quantidade de meio.

3.2.8. Condições de incubação

Devem ser considerados principalmente as exigências de luminosidade, temperatura, trocas gasosas e acúmulo de produtos tóxicos no meio.

3.2.8.1. Luminosidade

Não ocorre diferenciação de parte aérea em culturas mantidas no escuro. As características intensidade luminosa, período de exposição e qualidade da luz, são fundamentais.

a) Intensidade Luminosa

A fase inicial de desenvolvimento do explante *in vitro* (estágio I) requer baixa intensidade luminosa (até 1000 lux). Na fase de multiplicação de parte aérea (estágio II) as exigências são de 1000 a 3000 lux, e no estágio III (pré-transplante, aclimatização), recomenda-se de 3000 a 10.000 lux. Nesta fase o propágulo se prepara para a fotossíntese.

b) Qualidade da luz

A qualidade do espectro da lâmpada utilizada é de suma importância na iniciação de parte aérea e raiz em cultura *in vitro*. As lâmpadas recomendadas são fluorescentes brancas fria, Gro-lux ou outros tipos de lâmpadas com emissão nas regiões do vermelho (430 nm) e azul (660 nm). Estas regiões do espectro influenciam os processos morfogenéticos. As lâmpadas incandescentes não são recomendadas, pois emitem faixas do vermelho e vermelho distante e, este último não é adequado.

A região do azul é crítica para indução de parte aérea e a iniciação de raízes adventícias é estimulada por luz vermelha. Em *Heliantus tuberosus*, a iniciação de raízes adventícias em seções de tubérculos, é efetiva quando as culturas foram expostas a luz emitida próximo a 600 nm.

A luz vermelha também pode inibir a iniciação de raízes laterais, enquanto que a infra-vermelha pode reverter este efeito. A diferenciação de raízes laterais e adventícias parecem ter exigências diferentes. Assim, em cultura de tecidos, quando se objetiva a multiplicação de plantas, as lâmpadas devem conter emissões adequadas nas regiões do luz azul e vermelho, pois ambas estão envolvidas na iniciação de parte aérea e raiz.

Muitas das lâmpadas disponíveis foram desenhadas para serem utilizadas em casa de vegetação, onde a fotossíntese é importante, mas em cultura de tecidos a fotossíntese não é tão limitante. As lâmpadas fluorescentes devem ser trocadas a cada seis meses.

c) Período de exposição diária à luz

- Fotoperíodo

As exigências em fotoperíodo devem ser satisfeitas. O início de determinado processo morfogênético só se manifesta quando as culturas estão expostas à adequado comprimento do dia. Em geral, 16 horas de iluminação e 1000 lux de intensidade luminosa, têm se mostrado satisfatório para determinadas espécies, utilizando lâmpadas fluorescentes branco fria ou Gro-lux. A manutenção das culturas sob iluminação constante não é recomendada.

d) Quantidade total de energia

Deve considerar a intensidade luminosa e o número de horas de exposição por dia. Podemos citar que, em fumo não há exigências de fotoperíodo, mas, máxima formação de parte aérea ocorre com 16 horas de fotoperíodo e, 1000 lux de intensidade luminosa ($50-60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

3.2.8.2. Temperatura

Devem ser considerados os aspectos de flutuação diurna. As plantas em seu habitat natural não desenvolvem sob temperatura constante. Em cultura de tecidos o uso de temperatura constante deve-se a manutenção se diferentes espécies cultivadas numa mesma câmara de crescimento. Entretanto, alguns processos morfológicos exigem flutuações diurnas de temperaturas. É o caso de cultura de ovário de tomate, onde o número máximo de sementes formadas *in vitro*, ocorre em culturas submetidas a um regime diurno/noturno de 22/17°C. Menor número de sementes foi observado em cultura mantida sob temperatura constante de 27°C.

As exigências de temperatura para o desenvolvimento da planta em condições naturais devem ser consideradas como ponto de partida para estabelecer cultivo *in vitro* da espécie em questão. Espécies oriundas de habitat tropical, temperado e desértico têm diferentes temperaturas ótimas para o crescimento e desenvolvimento.

Outro aspecto importante é que, algumas vezes, obtém-se um bom desenvolvimento de plantas *in vitro*, mas quando transplantadas para o solo morrem porque estão dormentes, ou seja, será necessário uma boa aclimatização para que sejam quebradas as dormências antes de serem transplantas ao solo.

3.2.8.3. Umidade relativa

Em condições de clima seco pode ser pode usar tampas algodão, pois estas permitem boa troca gasosa, entretanto, o meio pode secar mais rápido em condições de baixa umidade relativa.

Quando em clima úmido cuidados devem ser tomados com relação as contaminações. As tampas de algodão podem ser usadas com cautela, e o uso de um desumidificador na câmara de crescimento é recomendado.

3.2.8.4. Trocas gasosas

As plantas produzem oxigênio, gás carbônico, etileno, aldeído e outros voláteis. Na natureza estes compostos são dissipados na atmosfera. O etileno acelera a senescência, abscisão foliar e amadurecimento. Álcool em alta concentração induz a formação de calos.

A cultura de tecidos é um sistema fechado. A acumulação de CO₂ em altas concentrações conduz à anaerobiose, fermentação e produção de álcoois. Em alguns casos, altas concentrações de gás carbônico induzem distúrbios no crescimento e desenvolvimento da planta *in vitro*. Deve-se observar a sensibilidade da planta a voláteis. A maneira de fechar o frasco é bastante importante.

Em cultura de tecidos de *Solanum tuberosum*, nunca se deve vedar os frascos com parafim, devido ao acúmulo de altas concentrações de CO₂ e etileno, fazendo com que os propágulos apresentem anomalias caracterizadas pelo entumescimento do caule, folhas ausentes ou pequenas, iniciação de raízes adventícias em vários pontos do caule, e o efeito indireto da necrose do ápice caulinar (deficiência nas trocas gasosas reduz a transpiração e a translocação do cálcio é dificultada). Em laboratórios comerciais de produção de batata-semente livre de viroses não é recomendado o vedamento das culturas.

Em locais onde há muita poluição ambiental recomenda-se o uso de filtro de carvão ativado.

3.2.9. Esterilização do meio de cultura

O tempo mínimo recomendado para esterilização de meio para cultura de tecidos de plantas é apresentado na Tabela 2.

Tabela 2: Período mínimo recomendado para esterilização de meio para cultura de tecidos de plantas. (Extraído do Catálogo da Sigma, 1990).

Volume do meio por recipiente (mL)	Tempo mínimo de autoclavagem (minuto)
25	20
50	25
100	28
250	31
500	35
1000	40
2000	48
4000	63

121°C e 1,05kg/cm² = 105kPa.

Os desinfestantes mais comumente usados em cultura de tecidos de plantas estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Desinfestantes mais comumente usados em cultura de tecidos de plantas. (Extraído do Catálogo da Sigma, 1990).

Desinfestante	Concentração (%)	Tempo de exposição (minuto)
Hipoclorito de Cálcio	9 – 10	5 – 30
Hipoclorito de Sódio	0,5 - 5,0	5 – 30
Água Oxigenada	3 – 12	5 – 15
Álcool etílico	70 – 95	5 – 15
Nitrato de prata	1	5 – 30
Cloreto de mercúrio	0,1 - 1,0	2 – 10

TÉCNICAS DE ESTABELECIMENTO IN VITRO

*José Ranieri Ferreira de Santana¹
Renato Paiva²
Edson José Artiaga de Santiago³
Patrícia Duarte de Oliveira Paiva⁴
Luciano Vilela Paiva⁵*

4.1. INTRODUÇÃO

Várias técnicas tem sido utilizadas no estabelecimento *in vitro* de tecidos vegetais. Dentre estas destacam-se a calogênese, suspensão celular, cultura de anteras, meristemas e de embriões. A escolha do tipo de técnica a ser empregada varia com a espécie estudada e com o tecido utilizado como explante.

4.2. CALOGÊNESE

Calos são tecidos que se desenvolvem em resposta a injúrias físicas ou químicas. As células tem certo grau de diferenciação e são desorganizadas podendo apresentar algumas áreas com tecido organizado. Apresentam tecido indiferenciado mas as células estão diferenciadas.

A cultura de calos pode ser iniciada *in vitro* colocando uma pequena parte de uma planta (explante) no meio de cultura, em condições assépticas. Sob o estímulo de substâncias de crescimento endógenas ou de reguladores de crescimento adicionado no meio, o metabolismo celular, que se encontra no estágio quiescente, é

¹ Professor Assistente, MS, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)

² Professor Adjunto, PhD, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA)

³ Pesquisador, EMBRAPA Amazônia Oriental, Belém/PA

⁴ Professor Adjunto, Dra., Departamento de Agricultura, UFLA

⁵ Professor Adjunto, Dr, Departamento de Química, UFLA.

modificado iniciando-se uma divisão ativa. Durante o processo, a diferenciação e a especialização celular são revertidas e o explante origina um novo tecido que é composto de células meristemáticas e não especializadas (Figura 13).

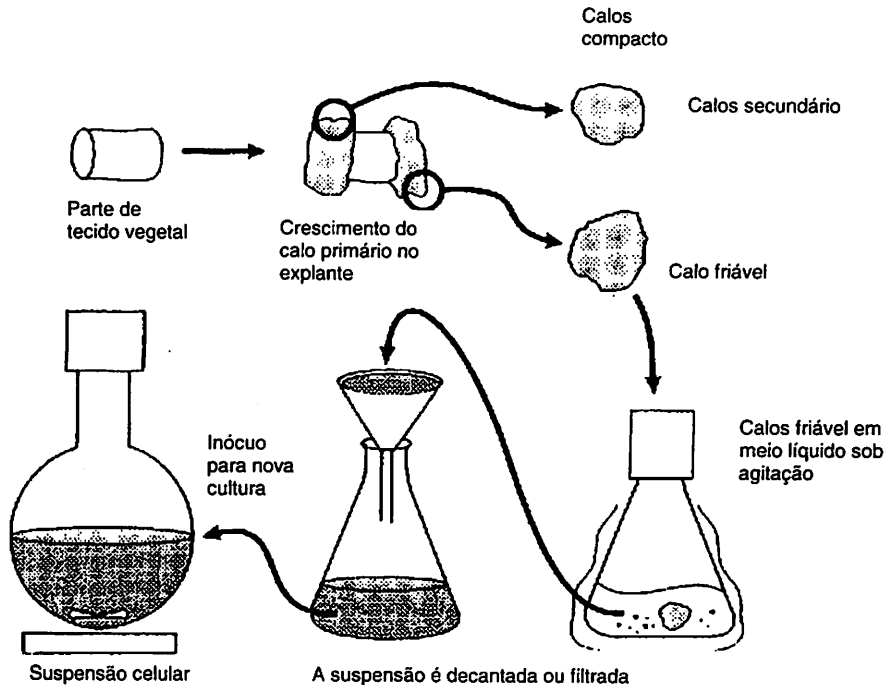


Figura 13: Etapas da iniciação de culturas de calo e suspensão celular (Modificado de George, 1993).

Durante a diferenciação, novos meristemas são formados no tecido e esses originam células parenquimatosas não diferenciadas, sem nenhuma estrutura organizada, característica do órgão ou tecido do qual elas foram derivadas. Embora o calo permaneça não organizado, o crescimento continua e, alguns tipos de células especializadas podem ser formadas. Tal diferenciação pode ocorrer em locais aleatórios ou associados a centros de morfogênese que originam órgãos como raízes, brotações e embriões. A produção de novas plantas de culturas não organizadas é frequentemente referida como regeneração.

4.2.1. Aplicação da cultura de calos

A cultura de calos tem várias aplicações como permitir o estudo do desenvolvimento celular, exploração de produtos secundários (metabólitos de plantas medicinais), obtenção de suspensões celulares (evitando o extrativismo da planta), propagação de espécies onde a via direta é difícil sendo neste caso, recomendada a sua utilização mesmo existindo risco de variação somaclonal. A cultura de calos permite também estudar a citodiferenciação e a morfogênese, além da indução de mutação através de técnicas químicas ou radiação.

4.2.2. Técnicas para estabelecimento de calos

a) Indução

Nesta fase, a seleção do explante bem como meio adequado e condições ambientais favoráveis (baixa luminosidade, temperatura normal) são decisivas para a indução. Tem-se nesta etapa um metabolismo ativo com células de tamanho constante e ocorrendo síntese de proteínas e DNA e a preparação da célula para divisão.

b) Divisão Celular

As células reverterem para um estágio meristemático (desdiferenciação). É uma fase de síntese onde ocorre decréscimo do tamanho da célula.

c) Diferenciação

Nesta fase há a expressão de certas rotas metabólicas. O explante utilizado pode não requer regulador de crescimento, pode requer somente auxina ou citocinina ou ambos.

4.2.3. Tipos de calos

Os tipos de calos usados variam de acordo com o objetivo do trabalho. Calos 'firmes' por serem altamente lignificados e de textura dura, são indicados para organogênese. Por outro lado, calos 'friáveis' (mole), que são frágeis e separam-se facilmente, constituem o tipo mais utilizado em suspensão celular. A coloração dos calos também é variável podendo ser amarelo, verde, branco, etc.

4.2.4. Tamanho, tempo de repicagem e manutenção de calos na subcultura

O tamanho dos calos deve ser suficiente para assegurar o crescimento. O inócuo deve possuir de 5 a 10 mm de diâmetro ou 20 a 100 mg. O tamanho é fundamental para que aconteça o efeito comunidade, onde uma célula é dependente da outra para se multiplicar.

Após um certo tempo de cultivo, os calos envelhecem e devem portanto serem repicados, ou seja, divididos (quando o tamanho permitir) e transferidos para outro meio. O tempo de repicagem é variável e dependente da taxa de crescimento. Em muitas espécies pode ser realizada em intervalos de 28 dias de cultivo.

Na manutenção do calos, o mais comum é usar o mesmo meio de cultura básico da indução. Algumas características básicas do calo com sinal de 'velhice': desaceleração do crescimento (pode ser avaliado pesando-se os calos de 3 em 3 dias, construindo-se uma curva de crescimento); necrose do tecido; escurecimento do tecido; secamento, que pode ser devido a exaustão de nutrientes, inibição do crescimento, etc.

4.3. SUSPENSÃO CELULAR

Consiste de células ou agregados de células dispersas crescendo em meio líquido em movimentação (agitação).

O início da suspensão celular é a utilização de calos friáveis em agitação. O inócuo na faixa de 2 g / 25 ml constitui uma quantidade suficiente para um bom efeito de comunidade.

As suspensões celulares são obtidas transferindo-se calos friáveis para meio líquido sob agitação. Em geral, a composição do meio de cultura para a obtenção de suspensões celulares é igual à do meio utilizado para o cultivo de calo.

O conhecimento das fases de crescimento de uma suspensão celular dentro de cada subcultivo é bastante importante, uma vez que o potencial embriogênico das células em suspensão pode ser mantido através da utilização de subcultivos nas fases de crescimento logarítmica das células.

4.3.1. Aplicações da suspensão celular:

É usada para obtenção de sementes sintéticas (embriogênese somática), isolamento de protoplastos, isolamento de mutantes, obtenção de resistentes a certos elementos (Alumínio, toxinas, herbicidas, sal), produção de metabólitos secundários e nos processos de transformação de plantas.

4.3.2. Métodos mais utilizados para medir o crescimento celular:

Para quantificar o crescimento de células em suspensão, são utilizados principalmente os métodos baseados no número de células, peso de matéria seca, peso de matéria fresca, volume de células e proteína total da célula.

Um calo típico iniciado de um explante passa por três estágios de desenvolvimento, que compreende a indução da divisão celular, um período de divisão celular ativa durante o qual as células diferenciadas perdem as características especializadas para tornarem-se desdiferenciada e um período no

qual a divisão celular é reduzida ou mesmo cessa, iniciando então a especialização celular. Esses estádios podem ser acompanhadas numa curva de crescimento caracterizadas por seis fases (Figura 14).

- *Fase lag*: é caracterizada por não ter ganho em número de células, pelo início da mobilização de metabólitos sem ocorrer qualquer divisão celular, pela síntese de proteínas e síntese de metabólitos específicos. A atenção deve ser dada à densidade do inóculo que afeta o comprimento da fase lag. Quanto menor o peso do calos utilizado, maior é a fase lag.
- *Fase exponencial*: é caracterizada por divisão celular intensa, aumento no número de células, porém células de tamanho pequeno com formação de agregados de células.
- *Fase linear*: a fase exponencial é seguida pela fase linear. O crescimento celular é ativo e as células adquirem competência para proceder a repicagem.
- *Fase de desaceleração*: ocorre uma redução na divisão celular. É no final dessa fase que se deve iniciar o processo de repicagem.
- *Fase estacionária*: a repicagem deve ser terminada ainda no início dessa fase quando não há divisão celular. As culturas não podem ser mantidas nessa fase por um período longo.
- *Fase de declínio*: as células começam a morrer, culminando com a lise celular.

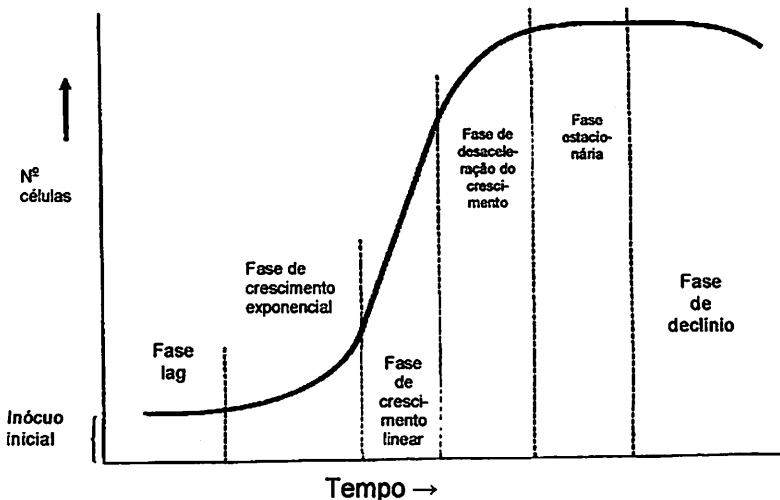


Figura 14: Curva de crescimento de uma suspensão celular.

4.3.3. Importância da curva de crescimento

A curva de crescimento de calos é calculada com o objetivo de se obter a época de repicagem (subcultura), para determinar onde há a maior produção de metabólitos (quando o estudo objetiva o metabolismo secundário). Esta fase é de desaceleração, pois os metabólitos secundários não constituem prioridade no metabolismo celular.

4.4. CULTURA DE ANTERAS

A cultura de anteras é uma técnica para a obtenção de plantas haplóides a partir de plantas normalmente diplóides. A descoberta que o grão de pólen poderia desenvolver embriões foi feita por acaso na década de 60. Atualmente, muitas plantas são produzidas a partir do grão de pólen imaturo ou calo que desenvolve a partir do micrósporo (Figura 15).

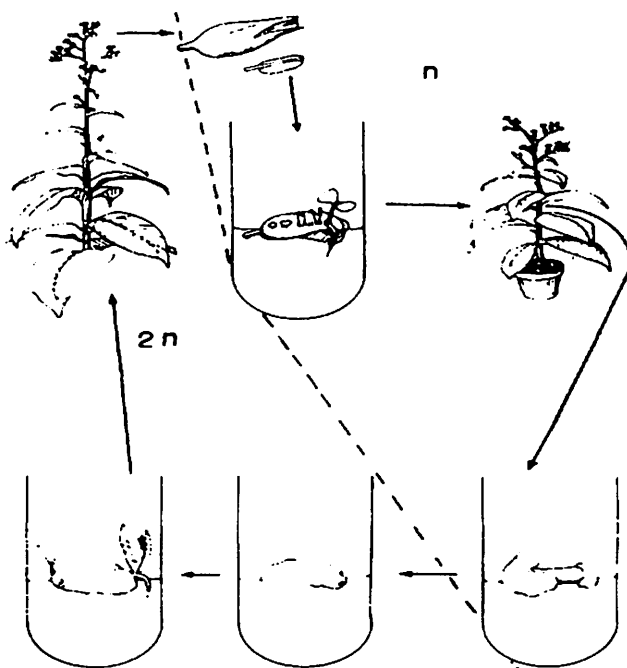


Figura 15: Cultura de anteras de *Nicotiana tabacum*. A flor é excisada quando as pétalas estão emergindo do botão (*superior à esquerda*). A antera imatura é removida assepticamente e inoculada em um meio padrão sem reguladores. Embriões somáticos desenvolvem do calo derivado do micrósporo haplóide. Os embriões haplóides ($1n$) para formar plântula (extraído de Hartmann *et al.*, 1997).

A cultura de anteras tem grande potencial para o melhoramento de plantas e é usada para a obtenção de plantas haplóides. A palavra haplóide refere-se a plantas que possuem o número gametofítico de cromossomos em seus esporófitos, ou seja, são originárias de um esporófito e contém metade do número de cromossomos da espécie.

Plantas haplóides podem ser obtidas *in vivo* através de polinização com pólen irradiado, polinização com pólen abortivo (estéril), tratamento do pólen com choques térmicos, hibridação distante. *In vitro* pode ser obtido pelo desenvolvimento da oosfera não fertilizada, pela cultura de anteras e ou grãos de pólen (diretamente por embriogênese e indiretamente via formação de calos).

As fontes de explantes usadas são anteras imaturas, que fornecem pólen uninucleado (por ocasião da primeira mitose) se constituindo no material mais promissor para indução de androgênese e botões florais fechados.

4.4.1. Protocolo para a obtenção de haplóides

O protocolo para cultura de anteras pode ser descrito resumidamente como segue:

- a) os botões florais fechados são desinfestados;
- b) faz-se uma incisão de um dos lados do botão floral e estames são delicadamente removidos. O filamento do estame é removido (com bastante cuidado para não danificar as anteras) e
- c) as anteras são inoculadas em meio de cultura.

4.4.2. Fatores que influenciam a androgênese

- 1) Genótipo da planta doadora: tem sido observado que gêneros, espécies e cultivares apresentam diferentes respostas na cultura de anteras.
 - 2) Condições fisiológicas e idade da planta: flores das plantas relativamente novas, no início da floração são mais adequadas do que botões florais de plantas velhas e em final de seu período de crescimento.
 - 3) Estádio de desenvolvimento do pólen: o micrósporo no estágio uninucleado é o mais adequado (antes ou logo após a primeira antese). Existe correlação entre o tamanho do botão floral e o estágio do desenvolvimento do pólen (importante ao se considerar a plóidia do embrião produzido). O estágio do desenvolvimento do pólen na antera pode ser determinado pelo corante acetocarmicima ou reagente de Schiff.
 - 4) Pré-tratamento dos botões ou anteras:
 - a) Tratamento térmico: deve ser feito em baixa temperatura (3 a 5° C). Assim se retém a viabilidade do pólen por mais tempo, retardando a senescência, sincronizando as células e prevenindo o aborto do pólen.
-

- b) Tratamento químico: aplicações de químicos como o etrel (paclobutrazol), hidrazida maleica, carvão ativado, podem induzir as anteras a formar em embriões.
- c) Tratamento físico: radiações ionizantes, pressões atmosféricas reduzidas (uso de dissecador); centrifugação.
- 5) Composição do meio de cultura: os meios mais utilizados são o MS, White, Nitsch. A sacarose é a fonte de carbono mais efetiva de carboidratos e sua concentração varia com as espécies.

A necessidade de reguladores de crescimento, também é variável. Suplementos orgânicos como caseína hidrolizada, água de côco, extrato de leveduras, aminoácidos, ácido ascórbico tem sido utilizados com sucesso.

4.4.3. Identificação de haplóides

A identificação de haplóides pode ser feita com genes marcadores, que produzem cor, cuja manifestação possa ser mostrada na semente ou plântulas. Marcadores morfológicos e por contagem de cromossomos, através de técnicas citológicas.

4.4.4. Problemas

Alguns problemas relacionados à cultura de anteras podem ocorrer quando são usadas técnicas inadequadas para se produzir plantas dipóides a partir de haplóides regenerados de cultura de anteras; uso de técnicas inadequadas de regeneração; ocorrência de elevada taxa de mutação (anormalidades); desdiferenciação de calo a partir de células dos tecidos somáticos da antera e; alta incidência de plantas albinas (principalmente em gramíneas).

4.4.5. Utilização de plantas haplóides

A técnica da androgênese permite:

a) Obtenção de homozigose. Em programas de melhoramento, onde é necessário a obtenção de linhagens, a homozigose destas pelos processos tradicionais só ocorre após 6 a 8 gerações de autofecundação ou retrocruzamento. Através da cultura de anteras, plantas haplóides são obtidas imediatamente, pois uma vez duplicado seu número de cromossomo, originam plantas diplóides que apresentam homozigose em 100% dos loci, reduzindo o tempo.

b) Produção de supermachos. Tomando-se com exemplo o aspargo, que é dióica, as plantas masculinas são mais produtivas. Há interesse na determinação de um método que produza por sementes todas as plantas híbridas F₁ heteróticas masculinas.

A partir de plantas femininas (XX - homogaméticas) e plantas masculinas (XY - heterogaméticas), por cultura de anteras, pode-se obter plantas haplóides tanto X

como Y, pela duplicação: XX (plantas femininas) e YY (supermachos). Usando estes supermachos na produção de híbridos, toda a progênie de plantas será masculina (XY) e portanto, mais produtiva e menos fibrosa.

A obtenção de haplóides *in vitro* pela cultura de anteras já é uma realidade em solanáceas, gramíneas e crucíferas.

4.5. CULTURA DE ESTRUTURAS ORGANIZADAS

O termo *cultura de órgãos* é usado para todas os tipos de cultura nos quais uma forma organizada de crescimento pode ser continuamente mantida. Inclui o isolamento asséptico de estruturas definidas como primórdio foliar, flores imaturas e frutos, e seu crescimento *in vitro*. Para a propagação vegetal, os mais importantes tipos de culturas de órgãos são:

a) *Cultura de meristema*

Consiste no estabelecimento do domo meristemático apical sem os primórdios foliares. A brotação apical tipicamente cresce, originando um único broto.

b) *Cultura de ápices caulinares*

É o estabelecimento *in vitro* a partir de brotações apicais maiores do que aquelas utilizadas para iniciar a cultura de meristema, tendo alguns primórdios foliares. Essas brotações apicais podem produzir múltiplas brotações.

c) *Cultura de segmentos nodais*

Os segmentos nodais são constituídos de gemas laterais isoladas, segmentos de caule com uma ou múltiplas gemas. Cada gema desenvolve para formar uma única brotação.

d) *Cultura de embriões*

É iniciada a partir de embriões zigóticos extraídos de sementes. Os embriões germinam originando brotos.

A cultura de meristema e a cultura de embriões são descritos com mais detalhes a seguir.

4.5.1. Cultura de Meristemas

Usualmente, a cultura de meristema refere-se ao crescimento do domo apical da brotação, excluindo as folhas primordiais.

O meristema não apresenta folíolos (Figura 16) sendo constituído por duas regiões diferentes, túnica e corpus. A túnica é constituída de uma a três camadas de células, a mais interna forma a epiderme e as outras duas restantes dão origem a folha ou somente a epiderme foliar. O corpus é a camada mais interna, responsável pela formação do restante da planta. O plano de divisão da túnica é anticlinal e do corpus é periclinal.

4.5.1.1. Aplicações da cultura de meristema

A cultura de meristemas é utilizada para estudos do efeito de fitorreguladores na iniciação foliar e no estudo do florescimento, na propagação vegetativa para obtenção de plantas livres de patogénos e, na multiplicação clonal rápida.

Os meristemas são amplamente utilizados na limpeza pois estes materiais são livres de vírus. Isto é explicado pelos seguintes fatos:

a) Crescimento contínuo do tecido. A divisão celular é intensa, o que aumenta a competição por metabólitos e desta forma o vírus não tem energia suficiente para sua multiplicação.

b) Ausência do tecido vascular (floema e xilema) no meristema. É muito difícil a passagem do vírus célula a célula (o DNA do vírus é maior que o plasmadesmata).

Vários fatores são determinantes para se obter sucesso na limpeza. Dentre estes, pode-se destacar:

- Tamanho ideal do meristema: de 0,1 a 1 mm. Menor tamanho implica num maior sucesso na limpeza, mais a sobrevivência é menor;
 - Localização do explante: explantes retirados da ponta do broto estão em um estágio mais jovem de desenvolvimento do que explantes da base;
 - Época de colheita: os explantes devem ser de fase de crescimento ativo.
-

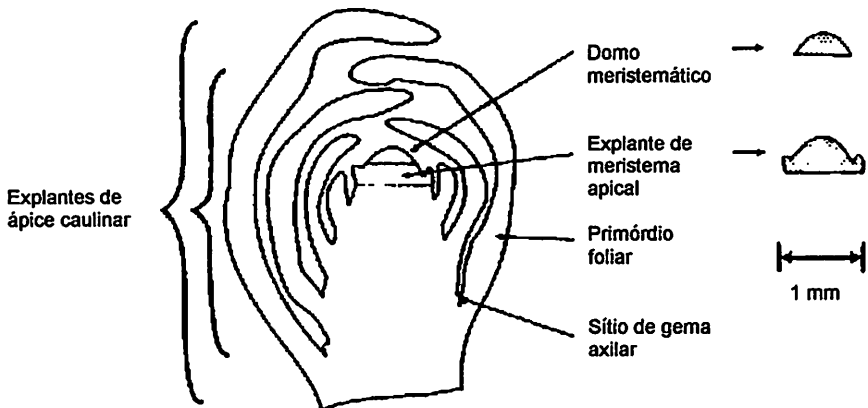


Figura 16: Localização de explantes no ápice caulinar (modificado de George, 1993).

4.5.2. Cultura de Embriões

A cultura de embriões pode ser definida como o isolamento estéril e crescimento de um embrião imaturo ou maturo *in vitro*, com o objetivo de se obter uma planta viável.

Embriões zigóticos ou de sementes são frequentemente usados vantajosamente como explantes em cultura de tecidos, por exemplo, para iniciar a cultura de calo. Em cultura de embriões, entretanto, os embriões são retirados das sementes e são individualmente isolados e "germinados" *in vitro* desenvolvendo uma planta por explante. A cultura de embriões isolados pode ajudar na produção rápida de plântulas de sementes que apresentam dormência embrionária ou embrião imaturo.

4.5.2.1. Tipos de cultura de embriões:

a) Cultura de embrião imaturo

Originado de sementes imaturas, é usado para evitar o abortamento natural. É mais difícil, devido a excisão e meio de cultura mais complexo.

b) Cultura de embriões maturos

Originado de sementes maduras, é usado para evitar a inibição de germinação de semente.

4.5.2.2. Estádios de desenvolvimento do embrião

Quanto mais imaturo for o embrião maior será o requerimento nutricional. No estágio globular há requerimento de meios mais complexo (fitormônios, altas concentrações de açúcares, água de coco, etc.). Antes do formato de coração, os embriões são bastante heterogêneos, não sintetizando fitormônio ou mobilizando compostos de carbono.

No estádios heterotróficos, os embriões requerem sais, açúcares, vitaminas, nitrogênio, citocininas, auxinas, água de coco (algumas substâncias podem ser opcionais). Quando aumentam de tamanho, tomam-se autotróficos e neste estágio requerem um meio mais simples.

Os embriões geralmente requerem alta taxa de açúcar (fonte de carbono e agente osmótico), pois têm um potencial hídrico muito negativo (conteúdo alto de sólidos). Uma alternativa para resolver a dificuldade imposta pelo potencial hídrico do embrião é fixar a sacarose e elevar o teor de de manitol (agente osmótico).

4.5.2.3. Fatores que afetam o sucesso da cultura de embrião

- 1) Genótipo: em algumas espécies o embrião cresce facilmente enquanto que em outras é muito difícil (há também diferenças entre cultivares de uma espécie).
- 2) Estádio de desenvolvimento do embrião no isolamento: é muito difícil desenvolver embrião muito pequeno *in vitro*.
- 3) Condição de crescimento da planta-mãe: crescer a planta-mãe em condições controladas resulta em um melhor desenvolvimento do endosperma, portanto melhora o crescimento do embrião isolado.
- 4) Composição do meio: embriões imaturos requerem uma composição mais crítica do que embriões maduros. Em ambos (maturo e imaturo) os macro e microelementos são importantes.

Os meios usados são sólidos: MS, White e B₅, em uma faixa de pH entre 5 a 6. Carboidratos (sacarose, usada na concentração de 2-3% e 8-12% para embriões maduros e imaturos, respectivamente) são fontes de energia e também agem abaixando o potencial osmótico, especialmente em embrião jovens.

O açúcar é usado em concentrações entre 0,6 a 0,8% (valores abaixo resultam em inibição de crescimento). Os reguladores de crescimento auxinas e citocininas geralmente não são usados. As vezes se utiliza giberelina. Substâncias de contribuição complexa como a água de coco são bastante utilizadas, especialmente para embriões imaturos.

- 5) Luz: fator pouco estudado. Algumas vezes mantém-se o embrião isolado no escuro por 7 a 14 dias.
-

- 6) Temperatura: a temperatura ótima é dependente da espécie, variando, geralmente entre 22 e 28°C).

4.5.2.4. Aplicações práticas da cultura de embriões

a) Eliminação da inibição (dormência) da germinação de semente

Em algumas espécies é absolutamente impossível obter a germinação *in vivo* devido a características genéticas ou fisiológicas.

b) Recuperação de híbridos de cruzamentos incompatíveis

No melhoramento, cruzamentos interespecíficos e intergenéricos para transferir genes de interesse da espécie selvagem para a cultivada (aumenta a variabilidade genética) podem produzir embriões abortivos devido a incompatibilidade.

Isto ocorre também em cruzamentos onde existam barreiras pré ou pós-zigóticas (sementes murchas e embriões abortivos). Os embriões híbridos são salvos e removidos antes que ocorra o aborto e, posteriormente cultivados *in vitro*.

c) Superação da dormência das sementes

Em algumas sementes ocorrem inibidores químicos endógenos ou há requerimentos específicos de luz e temperatura ou ainda a resistência física presente nas estruturas que recobrem o embrião. A cultura de embriões é uma alternativa para superar estes problemas.

d) Superação da esterilidade das sementes.

As causas de ocorrência de sementes estéreis em algumas espécies podem ser o desenvolvimento incompleto do embrião, mutações das estruturas que cobrem o embrião ou algum tipo de dormência recalcitrante para a qual nenhum método tem sido desenvolvido.

e) Germinação de sementes de parasitas obrigatórios.

Sem o hospedeiro, é impossível a ocorrência *in vivo*. Assim também a retirada dos embriões e cultivo *in vitro* pode suprir esta necessidade, permitindo o desenvolvimento de plantas.

f) Prevenção do embrião abortivo que ocorre com o amadurecimento precoce de frutos carnosos

Em cruzamento dos frutos (pêssego, ameixa, cereja) o transporte de água e nutrientes para o embrião imaturo é algumas vezes cortado muito cedo, ocorrendo o aborto.

g) Propagação vegetativa

Devido a sua natureza juvenil com alto potencial regenerativo, embriões são excelentes explantes para propagação clonal *in vitro*. Especialmente para coníferas e gramíneas.

Édson José Artiaga de Santiago¹
Renato Paiva²
Patrícia Duarte de Oliveira Paiva³
Cintia Guimarães dos Santos⁴
Guilherme Augusto Canela Gomes⁵

5.1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a cultura de tecido tornou-se importante técnica na tentativa de estabelecimento de metodologias de propagação de várias espécies. Por ser uma técnica que possibilita resultados bastante práticos, a cultura de tecido ainda necessita de informações básicas para seu perfeito entendimento.

Os métodos mais econômicos e disponíveis para propagação de plantas de uma determinada espécie podem mudar com o tempo. Maiores avanços podem vir de um melhor conhecimento dos fatores que controlam a morfogênese e a estabilidade genética *in vitro*.

Os laboratórios de micropropagação comercial utilizam quatro métodos básicos para multiplicar plantas *in vitro*: aumento de brotações axilares; segmentos nodais; brotações adventícias e embriogênese somática.

A redução nos custos de produção e a identificação de produtos, os quais são diferenciados pelo seu valor econômico, são estágios críticos para que a micropropagação possa ser expandida comercialmente.

A totipotência celular (capacidade da célula em formar um indivíduo idêntico ao indivíduo de onde esta foi extraída), associada aos efeitos do balanço hormonal, tem tornado possível o estudo da morfogênese *in vitro* e sua aplicação mais prática, a

¹ Pesquisador, EMBRAPA Amazônia Oriental, Belém/PA

² Professor Adjunto, PhD, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA)

³ Professora Adjunto, Dra., Departamento de Agricultura, UFLA

⁴ Mestre em Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, UFLA

⁵ Doutorando em Fitotecnia, Departamento de Agricultura, UFLA

micropropagação, técnica amplamente utilizada para a propagação de frutíferas de clima temperado.

A micropropagação é o desenvolvimento de novas plantas em um meio artificial sob condições assépticas, a partir de pequenos propágulos (explantes). Para as espécies lenhosas, as partes mais empregadas são ápices caulinares, micro-estacas, embriões, calos celulares, entre outras.

A cultura de tecidos difere dos métodos tradicionais, principalmente nas condições sob as quais a propagação é efetuada, mas não difere destes quanto a seus princípios. As diferenças óbvias referem-se ao fato de a micropropagação empregar propágulos pequenos, controle asséptico, controle do meio ambiente e rápida multiplicação, quando comparada com os métodos tradicionais.

5.2. FASES DA MICROPROPAGAÇÃO

5.2.1. Fase preparativa (Estádio 0)

Esta fase compreende o cultivo das matrizes em condições especial de higiene. Isto redundará posteriormente em obtenção de propágulos com menor incidência de fungos e bactérias. As plantas matrizes devem estar crescendo em vasos ou outros recipientes, em casa de vegetação com cobertura de vidro ou plástico. Será útil qualquer dispositivo que fornecer água para as plantas diretamente no vaso ou por capilaridade, como, por exemplo, irrigação por gotejamento. A duração mínima do regime de água deve ser testada para cada espécie.

O impacto deste estágio inicial aparentemente não limita somente a condição sanitária da planta, mas também a percentagem de sobrevivência na fase seguinte. Assim, empregando-se esta fase, pode-se desinfestar o material sem a retirada das folhas que conterão um menor número de inóculos, o que, conseqüentemente, redundará em uma maior sobrevivência.

Alguns parâmetros afetam sensivelmente a planta matriz de onde será coletado o propágulo. Entre eles, podem ser citados:

a) Luz

Os segmentos foliares provenientes de plantas estoques (matrizes) tratadas com luz vermelha produzem mais brotações por explante do que plantas não-tratadas.

b) Temperatura

As plantas lenhosas podem ser induzidas a surtos de novos crescimentos quando colocadas em temperaturas de 4 a 5°C por um período de tempo equivalente àquele necessário para a quebra natural de dormência.

A reatividade do explante logo após o estágio 0, ou seja, no estágio 1, pode ser controlada por um tratamento apropriado com reguladores de crescimento da planta estoque, das fontes de explantes ou do próprio explante.

Manipulações podem mudar a fisiologia das estacas de árvores velhas, de tal forma que elas se tornam propícias para uma propagação clonal comercial.

5.2.2. Início do cultivo (Estágio 1)

Nesta fase, deve-se prestar a atenção no seguintes fatores:

a) *Tipo de explante*

A escolha do explante recai, geralmente, nas gemas apicais ou axilares. O estágio de desenvolvimento do explante é de suma importância. A idade da planta matriz, a idade fisiológica do explante e seu estágio de desenvolvimento, assim como seu tamanho pode determinar o sucesso deste procedimento.

b) *Reações de hipersensibilidade*

Quando os tecidos são expostos a condições de estresse, tais como dano mecânico, que ocorre ao se isolar o explante da planta estoque, o metabolismo de compostos fenólicos é estimulado. Isto leva a reações de hipersensibilidade, tais como a liberação do conteúdo nas células danificadas, as reações nas células vizinhas, mas, sem mostrar sintomas de danos, e/ou a morte prematura de células específicas no lugar do ferimento ou o lugar de infecção.

De um modo geral, existem três tipos possíveis de resposta ao estresse ou dano mecânico:

- 1) oxidação de compostos fenólicos pré-formados, ocorrendo a formação de quinonas e material polimerizado;
- 2) síntese de monofenóis e;
- 3) síntese de derivados de polifenóis.

A síntese de monofenóis pode levar ao acúmulo de maiores quantidades de produtos pré-formados nos tecidos não danificados ou ao aparecimento de novos produtos que desempenham um papel no mecanismo de proteção do tecido contra a contaminação (fitoalexinas). O papel destes produtos já mencionados pode ser o de formar uma barreira física contra a invasão (lignina), ou um inibidor de crescimento microbiano (quinonas, fitoalexinas).

Um grupo especial de compostos fenólicos são as auxinas protetoras (antioxidantes que inibem a oxidação do AIA catalizado pelas peroxidases). Numa planta intacta, há um gradiente na inibição da degradação enzimática do AIA que é inversamente proporcional à idade do tecido. Isto mostra que a inibição diminui em direção à base do caule, ou a concentração de auxinas protetoras é maior nas folhas mais novas e nos internódios. De um modo geral, os fenólicos são produtos

facilmente oxidados. Tais produtos podem ser fitotóxicos, ou mesmo aumentar os processos de oxidação, pois após a ocorrência da oxidação, estes se tornam oxidantes muito fortes.

Alguns passos básicos para evitar o escurecimento do tecido e do meio na fase de início de cultivo incluem a:

- remoção dos compostos fenólicos produzidos (lixiviação, adsorção com carvão ativado ou polivinilpirrolidona);
- modificação do potencial redutor (agentes redutores ou menos oxigênio disponível);
- inativação das enzimas fenolases (agentes quelantes);
- redução da atividade da fenolase (baixo pH, escuridão, entre outros).

Nem todo antioxidante é eficaz nesta fase. Alguns são até mesmo recomendado por um curto espaço de tempo, porque rapidamente eles se tornam fortes oxidantes, como, por exemplo, o ácido ascórbico.

Alguns micronutrientes, tais como o manganês (co-fator de peroxidases) e o cobre (parte da complexa enzima fenolase), podem estimular a oxidação de fenóis. Desta forma, é conveniente usar estas formulações de sais em baixas concentrações.

5.2.3. Multiplicação (Estágio 2)

Nesta fase, cultivam-se brotações com a finalidade de aumentar o número de estacas. Nesta fase, inúmeros subcultivos podem ocorrer até atingir um número de brotações que serão enraizadas. Objetiva-se, nesta fase, a obtenção de brotações alongadas e aptas para a fase de enraizamento.

O método mais usado é o da formação adventícia de caules, pois facilita e acelera o aumento dos propágulos. Para cada espécie, no entanto, tem-se que determinar se este sistema produz plantas com as mesmas características genéticas da planta-mãe. A calogênese axilar também é empregada na micropropagação e garante a obtenção de indivíduos com idêntica composição genética da planta matriz (Figura 17).

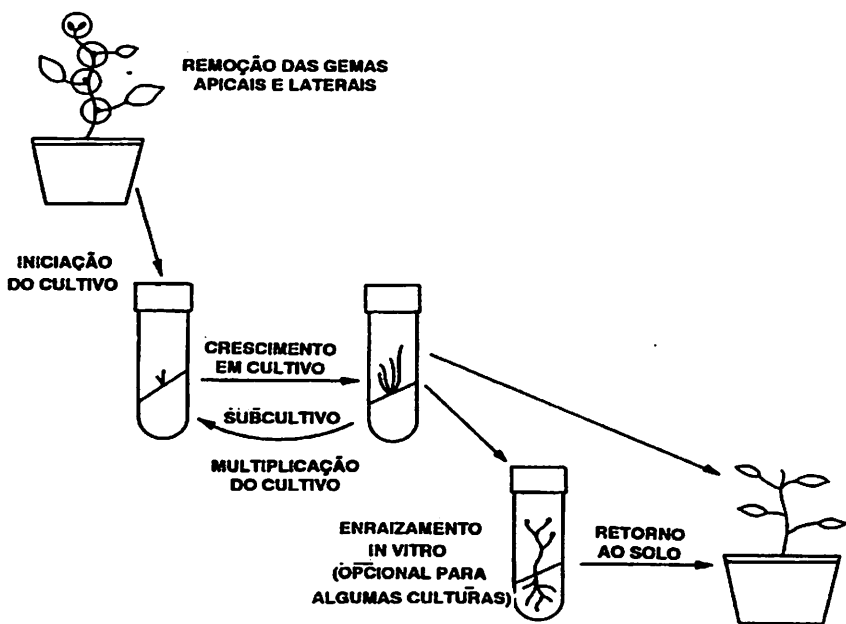


Figura 17: Diagrama da produção de mudas advindas da micropropagação de gemas terminais e axilares (adaptado de FACHINELLO et al., 1995).

Na fase de multiplicação, uma dosagem excessiva ou escolha inadequada de citocinina pode ser responsável pelo aparecimento de plantas epigenéticas (plantas que apresentam modificações fenotípicas, mas sem alteração na carga genética) que só poderão ser avaliadas no final do processo. Elevado número de subcultivos *in vitro* de morangueiro resulta em sérios distúrbios, tais como ausência ou fraco enraizamento, formação excessiva de flores, frutos pequenos e deformados e plantas heterogêneas.

5.2.4. Alongamento de brotações e indução de raiz (Estágio 3)

Nem sempre o alongamento das brotações é necessário. Às vezes, a simples transferência das brotações para um meio com ausência de citocininas é o suficiente para causar o alongamento.

A auxina é o regulador de crescimento utilizado na fase de indução de raízes. Após a indução radicular, não há necessidade da brotação permanecer na presença de auxina para a iniciação radicular. O emprego de auxina nesta fase geralmente leva à formação excessiva de calos na base das brotações. Raízes adventícias podem ser formadas, porém nem sempre estas apresentam conexão vascular.

5.2.5. Transferência para as condições de casa de vegetação (Estágio 4):

Esta é, sem dúvida (juntamente com a etapa anterior) uma das mais críticas em todo o processo da micropropagação. As plântulas que durante todo o tempo cresceram em condições totalmente artificiais (temperatura variando de $25 \pm 2^\circ\text{C}$; irradiância em torno de 2000 lux e fotoperíodo de 16 horas), passam para condições naturais.

As folhas das plantas micropropagadas apresentam uma menor quantidade de ceras epicuticulares que, associada a pouca funcionabilidade dos estômatos, as torna suscetíveis a grandes perdas de água por transpiração. Assim, todo o material deve permanecer por 1 a 2 semanas em um ambiente com luz solar indireta (sombrite) e alta umidade relativa, que poderá ser suprida com o emprego de nebulização em casa de vegetação ou telado.

5.3. PRODUÇÃO DE MUDAS LIVRES DE ENFERMIDADES

A propagação vegetativa permite a produção de plantas idênticas à planta-mãe. Porém, esse processo de clonagem propicia nestas plantas o acúmulo de vírus, o que leva a uma queda contínua na produtividade.

A limpeza clonal ocorre com o emprego de técnicas tais como:

5.3.1. Termoterapia

As plantas matrizes ou estoques são colocadas em ambiente com temperatura elevada, geralmente acima de 30°C ; nesta temperatura, que é variável de acordo com a espécie e variedade, as plantas devem permanecer por um período de tempo mínimo de 20 dias, mas, preferivelmente, acima de 40 dias. Este tempo é necessário para inativar o vírus ou micoplasma presente na planta. Concomitantemente, ocorre crescimento das brotações da planta estoque, que provavelmente não acusarão a presença do vírus. Estas brotações são então retiradas e poderão, após o enraizamento, servir de fonte de material vegetativo livre de vírus.

5.3.2. Cultura de meristema

Faz-se a retirada do meristema, tecido contido nas gemas vegetativas, terminais ou axilares. Este tecido é transferido para um meio de cultura contendo reguladores de crescimento, onde, através do processo de diferenciação, ocorrerá a formação de brotações que seguirão as etapas já mencionadas anteriormente (Figura 18).

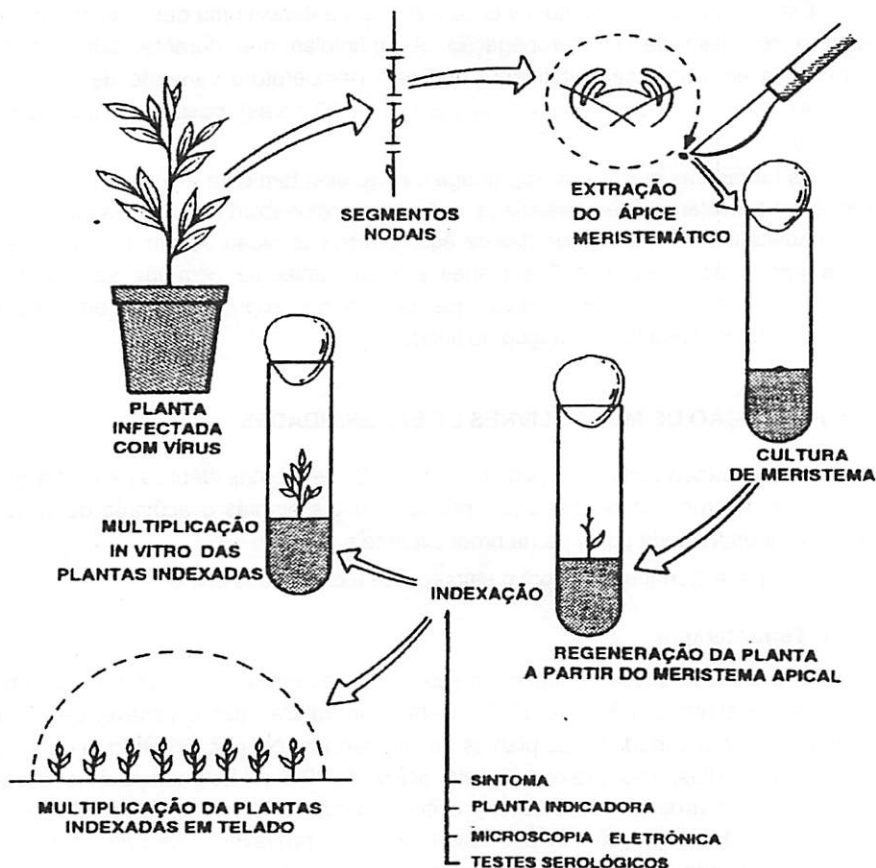


Figura 18: Diagrama da cultura de meristema (adaptado de FACHINELLO et al., 1995).

5.3.3. Termoterapia seguida de cultura de meristema

Este processo é um dos mais seguros para se obter a limpeza clonal. As plantas passam por um período de termoterapia que se sucede à retirada do meristema, o qual é inoculado em meio de cultura semelhante ao anterior.

5.3.4. Microenxertia

Este processo é empregado para aquelas espécies que não podem ser submetidas a temperaturas elevadas e, principalmente, para as espécies que, ao

serem multiplicadas *in vitro*, apresentam uma reversão ao estágio de juvenilidade. Neste caso, o meristema coletado é enxertado em porta-enxerto crescido *in vitro* (Figura 19). Este processo apresenta um baixo rendimento. É comumente empregado para os citros, podendo também ser usado para a cultura da ameixeira e pessegueiro.

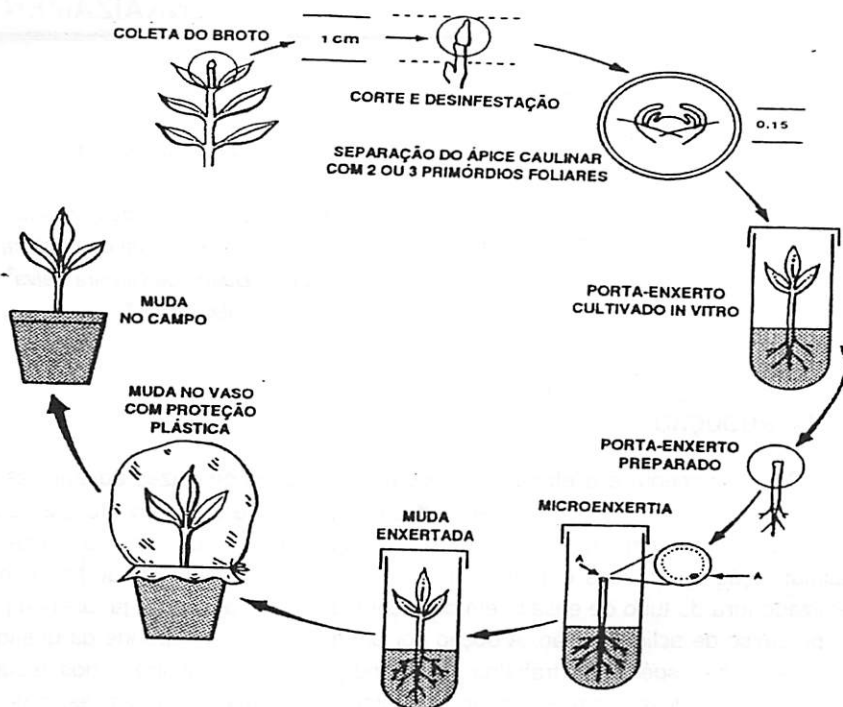


Figura 19: Diagrama da técnica de microenxertia para obtenção de plantas isentas de vírus e micoplasmas (adaptado de FACHINELLO et al., 1995).

Gustavo de Araújo Soares¹

Renato Paiva²

Édson José Artiaga de Santiago³

José Raniere Ferreira de Santana⁴

Patrícia Duarte de Oliveira Paiva⁵

Luciano Vilela Paiva⁶

6.1. INTRODUÇÃO

O enraizamento é a etapa onde ocorre a formação de raízes adventícias nas partes aéreas. Pode ser dividido em indução, iniciação e alongamento das raízes. Essa fase é a última do processo de propagação *in vitro*, realizada antes da aclimatização das mudas em ambiente externo. O enraizamento pode também ser realizado fora do tubo de ensaio, em condições de menor assepsia, já fazendo parte do processo de aclimatização. A opção por um dos sistemas depende da qualidade da estaca, da espécie de trabalho, das condições do laboratório e dos recursos disponíveis. Pode-se também criar um terceiro sistema, onde as estacas são mantidas *in vitro* até a indução da rizogênese e, posteriormente, são transplantadas em um substrato *ex vitro* para desenvolvimento das raízes (Figura 20).

Geralmente, é necessário que já se tenham formados estacas da espécie de trabalho, com folhas e outros tecidos diferenciados, para que se induza a formação das raízes. A capacidade de enraizamento dos explantes varia muito entre espécies

¹ Mestrando em Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA)

² Professor Adjunto, PhD, Departamento de Biologia, UFLA

³ Pesquisador, EMBRAPA Amazônia Oriental, Belém/PA

⁴ Professor Assistente, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)

⁵ Professora Adjunto, Dra., Departamento de Agricultura, UFLA

⁶ Professor Adjunto, Dr, Departamento de Química, UFLA.

e de acordo com o tratamento hormonal aplicado. Normalmente, o uso de auxinas favorece a indução e a iniciação radicular e inibe o alongamento, porém concentrações elevadas podem levar à formação de calos. Espécies herbáceas e regiões jovens das plantas geralmente enraizam mais facilmente que espécies lenhosas e regiões mais maduras.

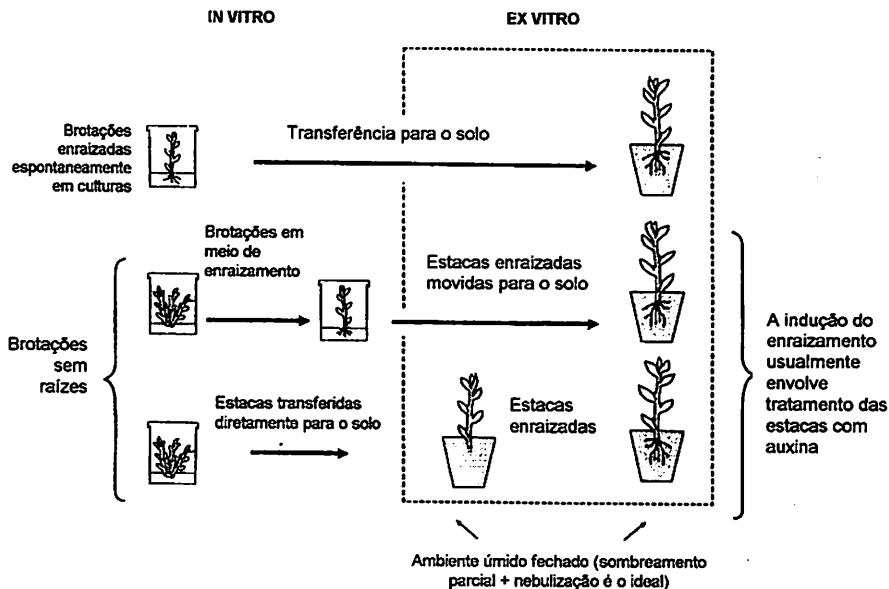


Figura 20: Etapas para enraizamento de brotações micropropagadas (modificado de George, 1993).

6.2. ENRAIZAMENTO IN VITRO

A vantagem deste tipo de enraizamento é o melhor controle das condições em que se trabalha e, com isso, a obtenção de um alto percentual de enraizamento. Este método é o mais empregado nos laboratórios de cultura de tecidos vegetais.

Por outro lado, a desvantagem do método é que as raízes formadas *in vitro* nem sempre são eficientes na absorção de água e de nutrientes, no momento da passagem das mudas para o substrato. Raízes produzidas *in vitro* podem possuir poucos pelos radiculares e conexões vasculares, e só começam a desenvolver o câmbio secundário quando são removidas do frasco de cultura. Algumas vezes, elas não se desenvolvem o suficiente para suportar o crescimento da muda, levando a

morte ou redução do crescimento da planta. Pode acontecer também a formação de um número pequeno de raízes longas e pouco ramificadas ao invés de um número grande de raízes mais curtas e ramificadas. Em alguns casos, foi observado que raízes de plantas formadas em tubo de ensaio, morrem depois de um certo tempo de transplântio para o solo e novas raízes então, são formadas. Esta situação no entanto não é regra pois, cada espécie reage de uma maneira ao processo de enraizamento.

O enraizamento *in vitro* pode ocorrer de duas formas: quando as raízes são formadas a partir de brotações sendo chamado de processo direto, e quando são formadas a partir de calo, denomina-se de processo indireto. Em ambos os casos, se não houver uma ligação vascular eficiente entre a parte aérea e a parte subterrânea, a aclimatização da muda é dificultada, podendo comprometer sua sobrevivência.

A rizogênese está associada à ação de reguladores de crescimento (internos e externos), principalmente nas fases iniciais da indução da formação das raízes. Algumas espécies, contudo, já possuem um nível endógeno de fitormônios suficiente e só enraízam na ausência de qualquer tipo de regulador, podendo ou não necessitarem apenas de uma pequena lesão na base da estaca.

Auxinas como o AIB (ácido indolbutírico), AIA (ácido indolacético) e ANA (ácido naftalenoacético) são os principais reguladores envolvidos no processo de enraizamento *in vitro*. Normalmente, o número de raízes formadas aumenta com a concentração de auxina utilizada, até o momento em que sua concentração fica excessivamente elevada, ocorrendo então inibição da formação das raízes, favorecendo o surgimento de calos.

Em alguns casos, a concentração de auxina que promove bom enraizamento não é a mesma que promove uma alta sobrevivência *ex vitro*. As concentrações mais utilizadas para induzir rizogênese normalmente estão entre 1,0 – 10,0 mg.L⁻¹ para AIA, 0,05 – 1,0 mg.L⁻¹ para ANA e 0,5 – 3,0 mg.L⁻¹ para AIB. Estas substâncias podem ser misturadas de várias maneiras para se encontrar a fórmula ideal para o enraizamento de cada espécie. A avaliação dos resultados encontrados utilizando-se diferentes concentrações e misturas de auxinas não deve considerar apenas a porcentagem de estacas enraizadas, mas também a qualidade, o tamanho e o número de raízes formadas. A auxina deve ser aplicada no meio de cultura ou anteriormente à inoculação do explante (no caso de enraizamento *ex vitro*), levando-se em conta que a sua concentração é inversamente proporcional ao tempo de permanência com o regulador.

Associadas às auxinas, outras substâncias também interferem de forma direta ou indireta no enraizamento dos explantes. Poliaminas, ácido sulfúrico, cloreto de magnésio e compostos fenólicos, como o floriglucina, atuam, por exemplo, estimulando a síntese de AIA ou liberando a auxina existente no explante. Já as citocininas, geralmente utilizada para estimular a formação de brotações, costumam inibir o enraizamento. Existem poucos casos em que uma citocinina não interfere ou

estimula a formação das raízes. As giberelinas funcionam como as citocininas, inibindo, na maioria das vezes, a rizogênese.

Alguns fatores ambientais, tais como tamanho dos recipientes de inoculação, meio de cultura, gases, substratos, luz, temperatura e o próprio explante, também afetam a formação de raízes. O tamanho dos frascos onde os explantes são colocados ajuda ou dificulta a formação e o crescimento das raízes, no momento em que se tornam uma barreira física. Logicamente, em frascos maiores se torna mais fácil conseguir o enraizamento. A concentração de sais no meio de cultura pode ser regulada de acordo com cada espécie, de forma que a redução da concentração iônica dos meios (50% ou 75% da força total do meio) pode favorecer esta etapa do processo de micropropagação.

A falta de oxigênio e o excesso de dióxido de carbono no recipiente de cultura dificultam a indução e o crescimento das raízes. Para melhorar a aeração e o desenvolvimento de raízes, recomenda-se o uso de substratos mais porosos alternativos ao ágar. Os substratos desse tipo mais utilizados atualmente são o papel de filtro esterilizado em forma de ponte, para evitar que o explante se afogue no meio líquido, a areia grossa autoclavada, a vermiculita também autoclavada, a perlita e as bandejas de espuma.

Quanto à luminosidade, o escuro, que normalmente estiola as brotações favorece o enraizamento das mesmas. Posteriormente, um período de luz estimula o alongamento das raízes formadas no escuro. A provável explicação a esse fato é que no escuro as auxinas são degradadas mais lentamente. Assim, auxinas exógenas devem ser fornecidas para os explantes antes ou depois deste período, pois nestes dois momentos a metabolização das auxinas será mais rápida. Formas alternativas de se reduzir a intensidade de luz na região formadora da raiz são o carvão ativado misturado no meio de cultura ou um simples sombreamento com material escuro na parte externa do frasco.

A temperatura ideal para enraizamento varia muito de espécie para espécie, mas, geralmente, obtém-se raízes em temperaturas mais altas que as das outras fases da micropropagação.

Finalmente, a qualidade do explante é muito importante para o sucesso do enraizamento. Explantes grandes ou pequenos demais dificultam o processo, o ideal é que eles possuam cerca de 2 centímetros. Explantes velhos e lignificados também apresentam eficiência menor de rizogênese, por serem tecidos já muito especializados. Em contra partida, um corte em sua base pode auxiliar na absorção do regulador e na remoção de barreiras morfológicas que impeçam a diferenciação do tecido.

Deve-se ressaltar que em cultura de tecidos vegetais, cada espécie ou até mesmo cada parte da planta utilizada como explante responde de uma forma. Todos esses fatores, internos ou externos, analisados podem ou não afetar a formação e o desenvolvimento das raízes e de maneiras completamente diferentes.

6.3. ENRAIZAMENTO *EX VITRO*

A principal vantagem do enraizamento *ex vitro* é o menor custo financeiro que esta técnica proporciona. As estacas brotadas, ao invés de serem inoculadas em meios de cultura com reguladores propícios ao enraizamento, são enraizadas fora das condições assépticas dos frascos de cultura, já fazendo parte da etapa seguinte, a aclimatização.

Calcula-se que os recursos economizados por esta técnica, cheguem a 75% dos gastos totais, o que corresponde justamente aos gastos com mão-de-obra e materiais apenas para esta etapa da micropropagação. Como um dos grandes problemas da cultura de tecidos de plantas são os gastos com a produção, esta alternativa é muito importante para obter uma produção com baixos custos.

Além disso, o enraizamento *ex vitro* reduz o tempo de cultivo e de comercialização da muda, pois elimina uma etapa do processo de micropropagação, misturando as etapas de enraizamento e aclimatização. Por serem substrato mais poroso e melhor arejado, as raízes formadas são mais funcionais e eficientes na absorção de água e nutrientes. Isso aumenta o número de sobreviventes na aclimatização e também diminui o tempo de formação da muda.

No entanto, o enraizamento *ex vitro* não possui apenas vantagens. Em algumas espécies, a taxa de enraizamento *ex vitro* é tão baixa, que a utilização deste processo é inviável. Em outras, a estaca, antes do enraizamento, necessita de passar por uma etapa chamada de "endurecimento", para conseguir sobreviver ao ambiente adverso da fase de aclimatização. A alta sensibilidade das estacas requer cuidados especiais para enraizar.

O "endurecimento" nada mais é do que alterar algumas características da estaca para que ela consiga sobreviver à fase de aclimatização, ou seja, transformar uma estaca fraca e frágil em uma forte e resistente aos estresses ambientais do meio externo. Para isso, existem algumas técnicas que proporcionam o "endurecimento" da estaca para que ela possa enraizar sem problemas. A resistência à perda de água, que ocorre em plantas em ambiente externo, pode ser conseguida através da redução do potencial hídrico e do aumento da deposição de ceras epicuticulares e da formação de estômatos funcionais. Isso é obtido aumentando-se, gradativamente, a concentração de sais, sacarose ou ágar no meio de cultura ou reduzindo-se, também gradativamente, a umidade nos frascos de cultura. O aumento da intensidade luminosa no laboratório e do suplemento de dióxido de carbono nos tubos e a diminuição da concentração de sacarose no meio de cultura pode intensificar o desenvolvimento e aprimorar o aparelho fotossintético das plantas, deixando-as melhor preparadas para enfrentar as condições de autotrofismo da fase de aclimatização.

A técnica de enraizamento *ex vitro* consiste em destacar brotações e plantá-las no substrato desejado. As estacas não podem ser nem muito grandes, nem muito

pequenas, pois esses extremos são de difícil manuseio, dificultam o enraizamento e demandam mais tempo para formar mudas. Estacas de tamanho entre 2 e 5 centímetros são as ideais. Se possível, o plantio deve ser em grupos, ao invés de isoladas, o que favorece o enraizamento, que, geralmente, ocorre em 2 a 5 semanas.

Existem vários substratos nos quais se pode realizar o plantio. Turfa, areia, vermiculita, perlita, bandejas de espuma, substratos comerciais como o Plantmax® e o Agromix® e solo esterilizado são os mais utilizados. O importante é que todos sejam submetidos a um processo de esterilização por calor ou irradiação, para garantir a assepsia do solo e evitar o aparecimento de pragas, fungos e bactérias. Se necessário, pode-se enriquecer o substrato com sais, do meio de cultura nutritiva ou reguladores de crescimento como auxinas, que aumentam a intensidade e a velocidade do enraizamento. Estes reguladores podem ser aplicados diretamente no substrato ou na passagem das estacas do tubo de cultura para o substrato.

Edson José Artiaga de Santiago¹
Renato Paiva²
Breno Régis Santos³
Patrícia Duarte de Oliveira Paiva⁴
Guilherme Augusto Canela Gomes⁵

7.1. INTRODUÇÃO

O termo aclimatização é definido como a adaptação climática de um organismo, especialmente uma planta, que é transferida para um novo ambiente, sendo todo esse processo realizado artificialmente. O termo aclimatização tem um significado similar, mas é um processo no qual as plantas ou outros organismos se tornam ajustados a um novo clima ou situação, como resultado de um processo essencialmente natural.

Muitas pesquisas têm sido realizadas para resolver o problema referente à aclimatização. Um grande número de planta micropropagada não sobrevive quando são transferidas das condições *in vitro* para o ambiente externo.

Esta passagem crítica se deve basicamente aos seguintes fatores:

7.2. ESTRESSE HÍDRICO

O estresse hídrico é causado pela transpiração excessiva de partes da planta, principalmente nas folhas, ou absorção inadequada de água pelas raízes e, em geral, é o maior problema no processo de transplante e aclimatização. Nas condições *in vitro*, as plântulas se desenvolvem com baixa luminosidade e elevada

¹ Pesquisador, EMBRAPA Amazônia Oriental, Belém/PA

² Professor Adjunto, PhD, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA)

³ Doutorando em Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, UFLA

⁴ Professora Adjunto, Dra., Departamento de Agricultura, UFLA

⁵ Doutorando em Fitotecnia, Departamento de Agricultura, UFLA.

umidade relativa com conseqüente redução do fluxo respiratório. Ao serem expostas a um ambiente com alta luminosidade e baixa umidade relativa, a taxa de transpiração aumenta, surgindo um déficit hídrico na planta.

A cutícula e o estômato são as causas primárias de perda de água pelas folhas. A cutícula é uma membrana composta por uma cutina matriz, juntamente com ceras internas e superficiais que protegem os tecidos das plantas. A função principal da cutícula é limitar a perda de água por transpiração. As plantas obtidas através da micropropagação possuem uma camada mínima ou inexistente de cera protetora sobre as folhas.

Outra causa da perda de água pela superfície das folhas é o controle ineficiente dos estômatos que não são funcionais e respondem lentamente ao estresse hídrico. A estrutura dos estômatos de plantas micropropagadas pode variar entre as espécies, porém todas apresentam estômatos muito mais abertos nas condições *in vitro* do que em estufa ou campo.

A morfologia e a densidade dos estômatos podem ser alteradas mudando-se as condições ambientes. Em plântulas de rosa, por exemplo, um aumento na luminosidade e uma diminuição na umidade relativa de 100 para 75%, resultou em estômatos semelhantes às plantas cultivadas em estufa.

7.3. FOTOSSÍNTESE

A estrutura e a morfologia interna das plantas micropropagadas são, inicialmente, muito diferentes daquelas cultivadas em condições de campo. Esta variação na anatomia ou ultra-estrutura pode afetar o processo de fotossíntese.

No processo convencional de micropropagação, os explantes ou plântulas, nos estágios de diferenciação, multiplicação e enraizamento, desenvolvem-se heterotroficamente.

No estágio de aclimatização as plântulas sofrem uma mudança drástica quando são removidas dos frascos onde a luz e as trocas gasosas são limitadas e existe grande disponibilidade de açúcar. Essa passagem faz com que mudem de heterotróficas para autotróficas, com grande gasto de energia.

7.4. ABSORÇÃO DE NUTRIENTES

As plântulas *in vitro* ao serem aclimatizadas, passam de um meio onde têm à disposição alta concentração de nutrientes para um substrato no qual são forçadas a iniciar o processo de absorção de sais para seu desenvolvimento. A emissão de novas raízes é muito importante, pois as formadas *in vitro* têm pouca capacidade de absorção e não respondem imediatamente ao momento do transplante, além de serem pouco funcionais, delicadas e propensas ao ataque de microorganismos.

7.5. FITOSSANIDADE

A fragilidade da plântula *in vitro* aliada à alta umidade relativa, na qual é aclimatizada, favorece o crescimento de fungos e bactérias. É essencial, portanto, que se faça uma prevenção de doenças para o sucesso do transplante, durante e após a aclimatização.

7.6. CONDIÇÕES PARA A ACLIMATIZAÇÃO

1) As plântulas devem apresentar aspecto sadio com sistema radicular e parte aérea proporcionais, a fim de garantirem maior taxa de sobrevivência;

2) A manutenção da alta umidade relativa, por alguns dias após o transplante, é considerada ponto crítico para a sobrevivência das plântulas. Um número significativo de laboratórios comerciais tem evitado o uso de um sistema automático de irrigação para este propósito, por tornar o meio excessivamente úmido, favorecendo o crescimento de fungos e algas. O sistema preferencial é o "fogging" ou nebulização, que pode evitar muitos dos problemas encontrados com sistemas de irrigação. Outros métodos incluem o uso de umidificadores ou o uso de áreas fechadas que retêm o vapor d'água;

O uso de antitranspirantes, para reduzir a perda de água durante a aclimatização, tem conseguido resultados controversos e deve ter seu uso limitado para algumas espécies;

3) As plântulas *in vitro* requerem baixa luminosidade relativa e quando submetidas ao aumento de luz sofrem um processo de destruição das moléculas de clorofila, tornando-se cloróticas e queimadas. Para evitar esses problemas, as plântulas podem ser removidas gradualmente, para uma intensidade de luz sob a qual manterá seu crescimento;

O controle de fotoperíodo também é importante para prevenir dormência ou controlar o ciclo de reprodução vegetativa em algumas espécies e o seu ajuste deve ser feito considerando-se a espécie, a estação do ano e os custos econômicos.

4) A temperatura do ar no qual as plântulas devem ser mantidas, durante a fase de aclimatização, deve estar na faixa entre 13 e 30°C e determinada, primeiramente, pela espécie da planta em questão;

5) O solo deve ter pH apropriado para cada espécie, ser tampão, fértil e suficientemente poroso para promover drenagem adequada e aeração. Alguns produtores aquecem o solo através de serpentinas de água quente, para maior atividade da raiz, promovendo o crescimento mais rápido da planta;

6) As plântulas desenvolvem-se melhor e crescem mais rapidamente em recipientes mais espaçosos. Existem vários tipos de recipientes como bandejas plásticas ou de isopor com células de diversos tamanhos, caixas de polietileno, sacos, copos plásticos, etc;

7) Para a fertilização muitos laboratórios adicionam, periodicamente, macro e/ou micronutrientes no substrato em que as plântulas são transplantadas;

8) Para o controle fitossanitário, é necessário que se tome alguns cuidados essenciais. Normalmente, antes do transplante, as plântulas são lavadas, de preferência, com água morna para retirada total do meio de cultura e plantadas em substrato esterilizado. Alguns autores recomendam a lavagem das plântulas com solução fungida, enquanto outros, não aconselham seu uso durante as primeiras duas semanas depois do transplante, pois podem ser fitotóxicos nesta fase. Outros métodos usados para garantir sanidade incluem o uso de desinfetantes no meio de cultura, nos recipientes e bancadas ou mesmo coberturas novas de polietileno ou tratadas para controle de patógenos. Mãos limpas e instrumentos limpos e desinfetados também são imprescindíveis.

FOTOMORFOGÊNESE IN VITRO

José Ranieri Ferreira de Santana¹

Renato Paiva²

Breno Régis Santos³

Gustavo de Araújo Soares⁴

Patrícia Duarte de Oliveira Paiva⁵

8.1. INTRODUÇÃO

O estudos dos efeitos da luz na morfologia e desenvolvimento em plantas regeneradas a partir de cultura de tecidos são bastante escassos na literatura. Sabe-se que a luz pode induzir múltiplas respostas sendo isto importante sobretudo no processo de micropropagação onde as plantas são crescidas em condição de luz artificial.

Quando a luz do dia é completamente substituída, o espectro da fonte de luz artificial torna-se particularmente importante e ainda, na maioria dos casos, isso é largamente ignorado em instalações de micropropagação comercial.

8.2. LUZ E LÂMPADAS

Todas as fontes de luz artificial que estão atualmente disponíveis diferem do espectro da luz do dia, o que traz implicações para a micropropagação. A energia da luz absorvida pelas plantas encontra-se numa faixa de frequência com comprimento de onda entre 400 e 700 nm, aproximadamente.

¹ Professor Assistente, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)

² Professor Adjunto, PhD, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA)

³ Doutorando em Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, UFLA

⁴ Mestrando em Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, UFLA

⁵ Professora Adjunto, Dra., Departamento de Agricultura, UFLA

Para produzir uma resposta, a luz deve primeiramente ser absorvida por um pigmento fotorreceptor. Nos vegetais, os dois pigmentos mais importantes são o fitocromo e o criptocromo. O criptocromo absorve luz na faixa do azul (400-500 nm) e próximo da região do ultravioleta (320-400 nm) do espectro. O fitocromo, em contraste, absorve principalmente nas regiões do vermelho (600-700 nm) e vermelho-distante (700-760 nm).

A maioria das instalações de micropropagação utilizam lâmpadas fluorescentes tubulares (brancas) como única fonte de luz. Entretanto, existem diferentes tipos destas lâmpadas no mercado, o que pode influenciar profundamente o processo de fotomorfogênese.

A baixa quantidade de comprimento de onda na faixa do azul que certas lâmpadas fluorescentes fornecem pode afetar algumas respostas morfogênicas. Toda lâmpada fluorescente emite alguma radiação na faixa do ultravioleta sem efeito, no entanto morfogenético.

8.3. RESPOSTAS DA PLANTA À LUZ

Os vegetais são inteiramente dependentes da fotossíntese e conseqüentemente da luz para sobreviverem. A fotossíntese requer a absorção de consideráveis quantidades de energia luminosa para atingir um crescimento satisfatório. Em contraste, o sistema fotomorfogenético requer pequena quantidade de luz.

A transferência de plantas obtidas pelo cultivo *in vitro* para o solo é um estágio em que muitas perdas ocorrem durante a micropropagação. Razão para isso é o pequeno desenvolvimento das plantas *in vitro* e a baixa atividade fotossintética.

8.4. FOTOMORFOGÊNESE E CULTURA DE TECIDOS

As três qualidades da luz que mais claramente influenciam o crescimento e morfogênese *in vitro* são: o comprimento, a intensidade e a duração da exposição à luz ou o fotoperíodo. Cada um desses atributos tem efeito sobre a fotomorfogênese e a fotossíntese. A influência pode ser direta, através de uma ação sobre o tecido já estabelecido *in vitro*, ou indireto, conseqüente da influência da luz nas plantas matrizes. No último caso, o crescimento ou morfogênese observado *in vitro* é modificado pelos tratamentos de luz aplicados na planta matriz antes dos explantes serem removidos. Os efeitos da luz sobre a fotossíntese não são de grande importância em cultura de tecidos, a menos que o crescimento autotrófico seja requerido.

O crescimento *in vitro* de tecidos vegetais organizados geralmente não é inibido pela luz, que é frequentemente requerida para se obter ótimos resultados. Por outro lado, a divisão celular inicial dos explantes e o crescimento de tecido de calos são, às vezes, impedidos pela luz.

8.4.1. Comprimento de onda

8.4.1.1. Crescimento, regeneração e morfogênese de calos.

Calos de algumas espécies podem ser induzidos e crescidos no escuro, enquanto que tecidos de outras plantas podem crescer melhor em luz contínua ou em um fotoperíodo irregular. Calos induzidos no escuro são frequentemente transferidos para a luz quando a morfogênese indireta é desejada. A regeneração a partir de calos é influenciada pela luz, mas a condição ótima varia com a espécie.

8.4.1.2. Indução de raízes adventícias

A indução de raízes adventícias é também um estágio crítico na micropropagação influenciado pela luz. Dependendo da espécie, o enraizamento pode ser induzido na ausência de luz, ou mesmo sob baixo nível de irradiância, principalmente luz vermelha.

8.4.1.3. Inibição do crescimento de calos

A inibição do crescimento de calos pode ocorrer quando estes são expostos à luz na faixa do azul. Possíveis causas desta inibição são devido ao aumento na produção de compostos fenólicos, que interferem na atividade de regulação do crescimento; à destruição da enzima citocromo oxidase envolvida em processos respiratórios, à inibição da síntese de citocinina natural, ou à produção de ácido abscísico cujo efeito mostra-se antagonístico para citocinina.

8.4.1.4. Formação de brotações

Em algumas espécies, reduzida exposição à luz na faixa do vermelho (655 nm) pode induzir a formação de brotações a partir de gemas laterais.

8.4.1.5. Desenvolvimento dos cloroplastos

Os cloroplastos originados em cultura de tecidos tendem a serem mais variáveis em estrutura do que aqueles presentes em tecidos foliares da planta matriz. Podem apresentar desenvolvimento inadequado e tilacóides com formas anormais.

8.4.2. Intensidade de luz (irradiância)

Além de apresentarem espectro diferente, as culturas *in vitro* são tipicamente desenvolvidas em intensidade luminosa 10 vezes menor que a luz do dia.

Existem várias razões para explicar porque baixa intensidade luminosa é usada:

- a) a provisão de altos níveis de iluminação artificial é onerosa e gera calor não desejado;
 - b) os frascos de culturas são selados, o que contribui para aumentar o calor no interior do frasco em alta intensidade luminosa devido ao "efeito estufa";
-

- c) a tecnologia da cultura de tecidos de plantas envolve o uso de tecidos não autotróficos suplementado com um carboidrato.

8.4.2.1. Crescimento e proliferação de brotos

O nível ideal de iluminação para os estágios I e II da cultura de tecidos deve ser entre $7-120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Entretanto, o cultivo inicial sob baixa irradiância pode ajudar a prevenir o escurecimento nas culturas de espécies sensíveis a este processo.

Muitos gêneros (ex. Aster, Chrysanthemum e Caryophyllaceae, dentre outros) requerem irradiância relativamente alta para a multiplicação das brotações, e cultivo em baixas irradiâncias pode causar brotações vitrificadas.

Uma intensidade luminosa de $40-150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ é sugerida no estágio III para atingir taxas máximas de sobrevivência quando se for transferir as plântulas para um ambiente externo.

8.4.3. Comprimento do dia (fotoperíodo)

Os efeitos fotoperiódicos nas plantas são energizados por luz de relativa baixa irradiância e são geralmente associados com o fitocromo. O comprimento do dia pode influenciar o crescimento natural dos níveis de substâncias dentro do tecido da planta. Dias longos têm o mesmo efeito de exposições à luz vermelha; longas noites (dias curtos) promovem respostas do fitocromo ao vermelho-extremo. Geralmente plantas que crescem em fotoperíodos longos mostram maior conteúdo endógeno de auxina do que em dias curtos.

PROBLEMAS NO CULTIVO *IN VITRO*

Breno Régis Santos¹

Renato Paiva²

Patrícia Duarte de Oliveira Paiva³

José Ranieri Ferreira de Santana⁴

9.1. INTRODUÇÃO

No processo de cultivo *in vitro* alguns problemas podem ocorrer tornando limitante a propagação. Dentre estes problemas pode-se citar a oxidação, o declínio no vigor e a vitrificação.

9.2. OXIDAÇÃO

Os explantes ao serem inoculados no meio de cultura podem apresentar escurecimento e liberar exudatos que tomam o meio de cultivo escuro. Este tipo de escurecimento é consequência dos ferimentos ocasionados no processo de extração dos explantes. Nem todas as substâncias liberadas no meio causam inibição no desenvolvimento do explante, mas frequentemente esta inibição de crescimento ocorre, podendo levar à morte dos tecidos.

O processo de oxidação é como sendo a mudança de coloração no explante e no meio de cultura causado por compostos fenólicos liberados pelo próprio explante. As substâncias encontradas em meio de cultura no cultivo de algumas espécies lenhosas foram identificadas como sendo taninos, flavonóides e fenóis. Ferimentos normalmente provocam oxidação, sendo que discos foliares apresentam maior oxidação do que segmentos nodais por sofrerem ferimentos em maior área. O efeito

¹ Doutorando em Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA)

² Professor Adjunto, PhD, Departamento de Biologia, UFLA

³ Professora Adjunto, Dra, Departamento de Agricultura, UFLA

⁴ Professor Assistente, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

inibitório no desenvolvimento dos explantes é atribuído à presença de taninos e fenóis, sendo a autotoxicidade dos exudatos variável com as cultivares, espécies e gêneros.

A ocorrência de oxidação pode ser geneticamente correlacionada, ou seja, em gêneros cujas plantas apresentam maiores teores de tanino ou hidroxifenóis a oxidação ocorre de forma mais intensa como é o exemplo de *Quercus*, *Rhododendron*, *Sorghum* e das coníferas. Numa mesma espécie, diferentes cultivares podem apresentar variações de tolerância à oxidação. Produção de pigmentos de diferentes colorações podem ser vermelho, marron claro e avermelhado, azul e lilás. Variações de intensidade na ocorrência dos pigmentos e na formação de necrose do explante também são observadas.

Pesquisas indicam que compostos como a cisteína, o carvão ativado, PVP, ácido ascórbico e ácido cítrico têm sido adicionados ao meio de cultura com o objetivo de controlar o processo de oxidação. A maioria destes compostos age adsorvendo os exudatos liberados pelos explantes os quais causam a oxidação. Uma técnica eficiente é a lavagem do explante com antioxidantes como ácido cítrico e ácido ascórbico antes da inoculação e a adição de carvão ativado ao meio.

O carvão ativado tem sido adicionado ao meio de cultura em concentrações que variam de 0,3 a 2,0%, e a sua ação consiste em adsorver os fenóis presentes no meio de cultura, além de atuar induzindo os processos de morfogênese e rizogênese. Em alguns casos, a adição de carvão ativado não é eficiente para controlar a oxidação, mas estabiliza o processo, evitando-se o acúmulo de fenóis.

A poliamina PVP possui também a capacidade de adsorver os compostos fenólicos evitando que estes oxidem e polimerizem. Além de estimular a embriogênese, o PVP pode também reagir com fenóis oxidados e prevenir a ocorrência de oxidação por enzimas fenolases. Esta substância é geralmente adicionada ao meio de cultura em concentrações que variam de 0,01- 4,0 %. A eficiência no uso de PVP e/ou carvão ativado, no entanto, varia de acordo com a espécie.

Modificações na composição dos meios de cultura tais como variações na concentração do meio MS, sacarose, exclusão ou diminuição em concentração de ferro e cobre, uso de reguladores de crescimento (variações em tipo e concentrações) além da adição de antioxidantes também podem ser eficientes para controle da oxidação.

O ácido cítrico atua como agente quelante de metais mas não é muito eficiente em retirar ferro da solução. Já o ácido ascórbico normalmente é acrescido ao meio de cultura, possuindo a propriedade de estimular a atividade metabólica dos tecidos. A efetividade destes ácidos só tem sido observada, quando adicionados ao meio em concentrações entre 10 e 140 mgL⁻¹, podendo reduzir a oxidação em 50%.

Em alguns casos, os explantes podem apresentar oxidação apenas no início da cultura, a qual é diminuída à medida que ocorre desenvolvimento. A idade dos explantes também influencia na ocorrência de oxidação; de modo geral, explantes mais jovens são menos propícios à oxidação do que explantes mais maduros.

A prevenção da ocorrência de oxidação pode ser feita minimizando os danos causados ao explante, removendo os compostos fenólicos produzidos ou através da alteração da composição do meio de cultura e a concentração ou tipo de reguladores de crescimento empregados. A remoção dos compostos pode ser feita ainda pela utilização de meios líquidos (facilitam a difusão dos compostos), de diferentes agentes de solidificação, além da adição ao meio de substâncias de adsorção.

Para a solidificação do meio de cultura de modo geral utiliza-se o ágar, mas existem indicações de que este também possa causar oxidação. O ágar é o agente solidificante mais utilizado em cultura de tecidos. É constituído de açúcares, galactose e uma fração neutra, a agarose, que possui forte capacidade de geleificar. O ágar possui graus variáveis de pureza, o que influencia na sua capacidade de solidificar e provocar reações com outros agentes no meio de cultura. Contém grande quantidade de sulfatos, os quais são bastante reativos e também já se identificou a presença de cobre, elemento capaz de acelerar o processo de oxidação. Alguns tipos de ágar - dependendo do fabricante, além do enxofre, podem ainda conter substâncias fenólicas. A utilização de outros produtos mais puros como agarose e phytagel tem sido bastante eficiente para permitir a ocorrência de oxidação.

9.3. DECLÍNIO NO VIGOR

Em algumas situações as brotações, depois de um certo tempo de cultivo, diminuem ou cessam o crescimento, sendo este processo denominado de declínio no vigor. O declínio está associado com a produção de substâncias fenólicas ou a outros fatores como vitrescência, habituação ou maturidade dos explante.

A perda de vigor pode ser também afetado por erros no balanço nutricional do meio de cultura, utilização de fitorreguladores inadequados ou falta de repicagem do material vegetal.

A ocorrência de clorose, abscisão foliar e redução do processo de crescimento são sintomas também relacionados à perda de vigor.

9.3.1. Declínio na taxa de proliferação

A taxa de proliferação de brotos axilares é bastante variável com as espécies assim como não é sempre constante. Algumas vezes a taxa de multiplicação aumenta até um máximo e depois decresce nas sucessivas subculturas.

O declínio na taxa de formação de brotos também ocorre freqüentemente em culturas que não são repicadas.

9.3.2. Habituação

No cultivo *in vitro* de algumas plantas tem sido observado a habituação pela citocinina, que consiste em uma excessiva multiplicação de brotos em meio livre de citocinina, mas os brotos produzidos são pequenos, e dão origem a poucas radículas adventícias dificultando o estabelecimento *ex vitro*.

9.4. NECROSES

Necrose pode ser descrita como sendo a morte de uma parte de um organismo vivo. Isto ocorre com explantes colocados *in vitro*, podendo ter uma perda parcial ou a de toda a cultura.

9.4.1. Necrose apical em brotações

9.4.1.1. Causas

9.4.1.1.1. Deficiência de cálcio

Necrose apical ocorre em culturas de brotos, principalmente os de plantas lenhosas. Embora exista outras causas, a mais comum é a necrose ocasionada pela deficiência de cálcio no ápice dos brotos cultivados, fator este atribuído a absorção inadequada de nutrientes do meio, ou falta de translocação. Em cultivo *in vitro*, a alta umidade limita a transpiração e conseqüentemente a translocação no xilema de íons e compostos, assim como o cálcio pode não alcançar os tecidos da região apical.

9.4.1.1.2. Substâncias de crescimento

Alguns fitorreguladores podem induzir a necrose apical, principalmente em subculturas.

9.4.1.1.3. Intervalo de subculturas

O amarelecimento e necrose foliar pode ser observado quando não são feitas subculturas com a freqüência necessária. Quando estes sintomas são observados, o intervalo entre as subculturas deve ser reduzido; como prática pode manter um alta taxa de proliferação das brotações. O tempo entre uma subcultura e a outra deve ser ajustado de acordo com a espécie que está sendo cultivada.

9.4.1.1.4. Gases poluentes

O gás ou álcool queimado opera com um limitado suplemento de ar, emitindo grandes quantidades de gases como o metano, butano, etano, propano, etileno, metanol e etanol. Quando se utiliza chama para flamar instrumentos e as bordas dos vasilhames utilizados para o cultivo, o acúmulo de gases pode ser alto. Esses

gases provocam a abscisão foliar, podendo causar a paralisação da cultura, ou ainda ocasionar a morte das brotações.

9.4.2. Como evitar a necrose

Permitir que o cálcio fique mais disponível é uma prática que pode evitar o aparecimento de necroses. Pode ser feito ainda incremento na concentração de cálcio no meio de cultivo; ou alteração no ambiente físico no qual a cultura está crescendo, permitindo assim um aumento na transpiração. O incremento de cálcio no meio pode ser feito adicionando-se nitrato de cálcio.

Outra prática que pode auxiliar é a redução dos gases tóxicos. Neste caso deve-se evitar as chamas amarelas quando for flambar os instrumentos e os frascos na câmara de fluxo laminar, o ideal é regular a chama para que fique com a coloração azul.

A utilização de algodão para o tamponamento dos tubos de ensaio onde se está cultivando os brotos permite uma troca gasosa mais efetiva com o meio externo, reduzindo a concentração dos gases tóxicos no recipiente de cultivo. Também pode ser utilizadas outras formas de tamponamento que permitam esta troca de gases.

9.5. VITRIFICAÇÃO (HIPERHIDRICIDADE)

A vitrificação ou hiperhidricidade é definida como o processo no qual os explantes apresentam anatomia, morfologia e fisiologia atípicas em comparação com outras plantas cultivadas *in vitro*. As alterações na estrutura das plantas cultivadas *in vitro* são sintomas bastante prematuros de uma complexa síndrome de características anormais.

Em algumas condições de cultivo, pode-se detectar tecidos e órgãos altamente anormais após um certo período, os quais apresentam propagação reduzida quando transferidos para outro meio de cultivo, ou quando transferidos para o meio externo. Isto pode levar a perda de 60% da cultura de brotos ou plântulas em trabalhos de micropropagação comercial.

A "síndrome do broto de vidro" como também é chamado pode ocorrer em vários níveis de severidade. Inicialmente, apenas uma parte do broto, ou uma ou duas folhas podem ser afetadas. As brotações de culturas que demonstram sintomas leves freqüentemente crescem mais rapidamente do que o normal e pode mostrar altas taxas de brotações axilares. Esta vantagem é perdida em condições mais severas de vitrificação.

Em casos mais extremos, brotos vitrificados tem internódios curtos e o ápice aparece fasciculado. Os brotos afetados freqüentemente apresentam-se inchados e com uma coloração verde claro e suas folhas são translúcidas, aquosa e com aparência de vidro; as folhas se apresentam também alongadas, túrgidas e frágeis,

com uma coloração verde azulada. Algumas vezes a folhas de brotos afetados apresentam-se grossas e enroladas, e podendo aparecer regiões de coloração verde escuro, devido a superposição de células. Brotos altamente anormais produzem raízes adventícias ou alguma fraca radícula.

9.5.1. Ocorrência

A vitrificação pode ocorrer em culturas de brotos e nós, em regeneração de brotos a partir de calos, em todas as espécies. É mais freqüente em massa de calos de plantas lenhoas, mas também ocorre em plantas herbáceas. Por exemplo, plantas da família Caryophyllaceae, são particularmente vulneráveis.

O grau de susceptibilidade e o aparecimento dos sintomas não está apenas vinculado à espécie das plantas, mas também depende da natureza da cultura. Pode-se encontrar vários graus de vitrificação em um mesmo meio de cultivo ou em meios diferentes para uma mesma espécie.

A vitrificação pode ser consequência da difusão passiva da água dentro dos tecidos ou um fenômeno ativo relacionado a um distúrbio no processo metabólico da planta.

9.5.2. Fatores que influenciam a vitrificação

Os sintomas da vitrificação ocorrem com menos freqüência em culturas que se desenvolvem mais rapidamente. Quando se busca melhores condições de cultivo para cada espécie, diminui-se expressivamente o risco de ocorrer a vitrificação; ao se utilizar condições de cultivo que limitam o crescimento, a hiperhidricidade ocorre com mais facilidade. Os brotos apresentam sintomas de vitrificação mais freqüentes quando se utiliza concentrações de BAP acima de $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$, suplementado com sacarose e baixas concentrações de sorbitol.

A vitrificação tende a ser promovida por altas temperaturas, baixa irradiância luminosa ou em culturas mantidas no escuro.

Broto que se desenvolvem em condições contínuas de alta umidade relativa apresentam maior susceptibilidade à vitrificação, pois este é provavelmente o ambiente mais favorável para ocasioná-la. Culturas mantidas em meio líquido, incluindo aquelas realizadas com suportes (ponte de papel) geralmente desenvolvem a vitrificação mais facilmente do que aquelas que são cultivadas em meio sólido.

Em algumas plantas, brotações normais cultivadas em meio sólido ficam totalmente vitrificadas quando são transferidas para um meio de cultivo líquido.

A condição de vitrificação geralmente ocorre quando se utiliza meio MS com a concentração máxima de seus sais; entretanto se reduzir as concentrações dos macronutrientes não se observa a ocorrência da vitrificação. Outros fatores do meio como concentração de sacarose, pH e potencial hídrico também influenciam a

ocorrência de vitrificação. Condições de cultivo como por exemplo luminosidade e trocas gasosas constituem outros fatores de influência.

Em várias culturas a indução da vitrificação pode ser também influenciada pelo tipo e concentração dos reguladores de crescimento utilizados. As citocininas são particularmente responsáveis pela indução da vitrificação em brotos quando estes estão sendo cultivados em meios que possuam deficiência em sua composição. A citocinina BAP tem sido observada como indutor da vitrificação quando utilizada em altas concentrações. Isto pode ser evitado transferindo a cultura para um meio que não possua BAP. As auxinas podem às vezes induzir a vitrificação entretanto, a adição de auxinas no meio contendo citocininas, freqüentemente aumenta a proporção de vitrificação. O ácido giberélico pode ser utilizado no controle deste problema.

9.5.3. Prevenção da vitrificação

Existem vários fatores que podem auxiliar na prevenção da vitrificação, dentre estes pode-se destacar:

- 1) Redução da umidade relativa no ambiente *in vitro*.
 - 2) Aumento da concentração de ágar no meio semi-sólido.
 - 3) Controle da concentração de sacarose.
 - 4) Utilização da técnica de duas fases (meio líquido e sólido) no meio de cultura .
 - 5) Em meio líquido, utilizar suportes porosos para sustentação dos explantes (ponte de papel).
 - 6) Em meio líquido pode adotar a técnica de submersão temporária, onde o material vegetal é periodicamente mergulhado no meio de cultura.
 - 7) Redução da concentração de íons de amônio no meio de cultivo.
 - 8) Ajuste correto do pH do meio de cultivo.
 - 9) Adição ao meio de cultivo um ou mais ácidos orgânicos como o citrato, succinato ou malato para auxiliar a assimilação do NH_4^+ .
 - 10) Redução da concentração de micronutriente no meio de cultivo.
 - 11) Substituição da sacarose por frutose ou galactose.
 - 12) Transferência da cultura para um meio de cultivo ausente de fitorreguladores. Isto possibilita a formação de novos brotos sem os sintomas da vitrificação.
 - 13) Diminuição do uso de citocininas ou restrição do uso do BAP em específico, substituindo-o por outros compostos com atividade similar. Pode-se também aumentar o número de subcultivos.
-

- 14) Utilização de um balanço mais adequado entre auxina / citocinina para a espécie estudada.
 - 15) Utilização de alta de luminosidade.
-

PRINCIPAIS APLICAÇÕES DA CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

*José Raniere Ferreira de Santana*¹

*Renato Paiva*²

*Patrícia Duarte de Oliveira Paiva*³

*Luciano Vilela Paiva*⁴

10.1. INTRODUÇÃO

As técnicas de cultura de tecidos têm sido empregadas de diferentes formas no desenvolvimento de novas cultivares de plantas. A cultura de tecidos pode oferecer novas alternativas aos programas de melhoramento em suas diferentes fases e, muitas vezes, oferecem soluções únicas.

10.2. APLICAÇÕES DA CULTURA DE TECIDOS NA PROPAGAÇÃO ASSEXUADA

a) **Limpeza de material:** As espécies que são propagadas assexuadamente ficam expostas a problemas fitossanitários, especialmente viroses, as quais, por serem de natureza sistêmica, podem permanecer por tempo indeterminado nas plantas. A cultura de meristema tem-se mostrado bastante eficiente na obtenção de plantas livres de vírus, considerando-se que a distribuição das partículas viróticas na planta segue um gradiente decrescente em direção ao ápice. Outra vantagem do uso de meristema é a conexão vascular incipiente desta região com o restante dos tecidos. A associação da cultura de meristema com a termoterapia proporciona uma melhor eficiência no controle de certas viroses. Posteriormente, a limpeza das

¹ Professor Assistente, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)

² Professor Adjunto, PhD., Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA)

³ Professor Adjunto, Dra., Departamento de Agricultura, UFLA

⁴ Professor Adjunto, Dr., Departamento de Química, UFLA.

plantas obtidas deverá ser comprovada por indexação, seja ela por plantas indicadoras, técnicas imunológicas ou marcadores moleculares.

b) Recuperação do vigor e da produtividade: Fatores biológicos (doenças e pragas) podem diminuir a qualidade do material vegetal e, conseqüentemente, sua produtividade. Um declínio gradual no vigor e na produtividade contribui para o desenvolvimento de doenças, que podem expressar sintomas ou permanecer latentes.

c) Multiplicação de cultivares: Uma das principais vantagens do uso da propagação *in vitro* é a alta taxa de multiplicação que pode ser obtida. Neste caso, um conjunto de indivíduos geneticamente idênticos são produzidos à partir de um único explante. Este processo de propagação de um indivíduo selecionado é conhecido como *clonagem*. Além do mais, pode ainda constituir uma fonte de material juvenil para o caso de variedades ou linhas promissoras que se encontram atacadas por doenças sistêmicas.

d) Germinação de sementes *in vitro*: Em espécies com germinação lenta ou desuniforme, a germinação *in vitro* de sementes é uma importante alternativa para superar a fase inicial do desenvolvimento vegetal.

10.3. APLICAÇÕES EM FITOPATOLOGIA

As técnicas de cultura de tecidos têm oferecido contribuições importantes na área da fitopatologia. Sistemas de co-cultura de patógenos com os tecidos de plantas hospedeiras permitem o estudo das relações entre os dois organismos em condições controladas, levando à descoberta de mecanismos de patogenicidade e de resistência a nível celular. Como mencionado anteriormente, a recuperação de plantas livres de vírus e de outros agentes causadores de doenças é uma outra grande contribuição da cultura de tecidos à fitopatologia. As técnicas de cultura de tecidos também têm sido utilizadas com sucesso na manutenção de nematóides e de outros parasitas obrigatórios, seleção de plantas resistentes a toxinas e no estudo do efeito mutagênico de toxinas.

10.4. APLICAÇÕES NO MELHORAMENTO GENÉTICO

Coleções de plantas que asseguram variabilidade genética são parte essencial de qualquer programa de melhoramento genético. A necessidade de preservação dos recursos genéticos existentes assume uma importância enorme face a erosão genética que se verifica em muitas espécies.

As aplicações da cultura de tecidos em programas de melhoramento genético podem ser:

a) Aumento da variabilidade genética para fins de seleção: Pesquisadores podem explorar a variabilidade genética mediante o uso de variantes somaclonais, que são plantas com características morfológicas distintas da planta matriz obtida através do cultivo *in vitro*.

b) Introgessão de genes de interesse para espécies-alvos: A quebra de barreiras de incompatibilidade genética pode ser obtida mediante a polinização *in vitro*, cultura de embriões e fusão de protoplastos.

A cultura de embriões tem sido utilizada visando estender as possibilidades de hibridação interespecíficas e evitar o abortamento dos embriões. Pode ser utilizada também em programas de melhoramento onde o número de sementes resultantes dos cruzamentos é baixo, onde não ocorre formação de endosperma e ou desenvolvimento dos cotilédones ou quando as sementes perdem rapidamente a viabilidade durante o armazenamento. A cultura de embriões também proporciona a obtenção de plântulas saudáveis *in vitro*, que podem ser propagadas rapidamente e avaliadas antes dos ensaios de campo.

A cultura de protoplastos (células sem a parede celular) constitui um sistema apropriado para a realização de estudos fisiológicos e bioquímicos e para diferentes manipulações genéticas. A fusão de protoplastos (hibridação somática) envolve a fusão de duas células somáticas fundindo o citoplasma de ambos os pais, diferindo, portanto, dos cruzamentos sexuais, onde apenas a planta-mãe contribui com o citoplasma.

c) Aceleração de programas de melhoramento: Através da germinação de sementes *in vitro* das plantas melhoradas, clonagem de genótipos para testes de capacidade de combinação, cultura de anteras e micrósporos para a obtenção de haplóides e limpeza clonal.

d) Banco de germoplasma *in vitro*: As coleções de germoplasma são, normalmente, mantidas em campo, o que ocasiona altos custos de manutenção, além do material ficar exposto a pragas e doenças. A conservação de material vegetal *in vitro*, seja por criopreservação (manutenção em baixas temperaturas) ou sob condições de crescimento lento oferecem como vantagens o pouco espaço ocupado, a possibilidade de contaminação por doenças e pragas é praticamente nula e a taxa de propagação é elevada. Com isto, reduz-se os custos de manutenção de coleções de germoplasma e evita-se a transmissão de patógenos sistêmicos de uma geração à outra. Além disto, a alta organização do explante permite que as plantas assegurem um grau considerável de estabilidade genética, mantendo suas características varietais.

e) Obtenção de plantas transgênicas: Os métodos de transformação utilizados para gerar plantas geneticamente modificadas exigem que estas plantas passem pelo cultivo *in vitro*. No processo de transformação via bactéria *Agrobacterium tumefaciens* ou *Agrobacterium rhizogenes*, tecidos alvos de transformação são mantidos na presença de bactérias contendo genes de interesse.

É durante o cultivo *in vitro*, conhecido como co-cultivo, que a bactéria transfere o gene de interesse para o tecido alvo. Posteriormente, através do uso de meios de cultura seletivos faz-se a identificação das células eficientemente transformadas. O cultivo seletivo também é utilizado para identificar as células que forma transformadas mediante o processo transformação por biobalística, que se baseia no bombardeamento do tecido alvo por partículas de ouro ou tungstênio contendo aderidos a essas, plasmídeos com os genes de interesse.

ALGUNS CONCEITOS EM CULTURA DE TECIDOS

Breno Régis Santos¹

Patrícia Duarte de Oliveira Paiva²

Renato Paiva³

Luciano Vilela Paiva⁴

ABA: (ácido abscísico): Hormônio vegetal pertencente à classe de sesquiterpenos, ou seja, é constituído de três unidades de isopreno. Está envolvido no fechamento de estômatos, tolerância à dessecação e manutenção da dormência de sementes.

Ácido Abscísico: fitohormônio inibidor de germinação. Também atua no mecanismo de fechamento do estômatos.

Aclimação: Ajuste de uma planta a um novo clima ou situação como resultado de um processo essencialmente natural.

Aclimatização: Adaptação climática de um organismo, especialmente uma planta, o qual é transferido para um novo ambiente, sendo todo esse processo realizado artificialmente.

Adventício: Órgão vegetal formado em posição diferente daquela onde se origina no curso normal de desenvolvimento. Por exemplo, raiz desenvolvida em um segmento de caule ou diferenciação de uma gema a partir da raiz.

Ágar: Polissacarídeo extraído de algas marinhas. É utilizado como agente gelificante, principalmente, em culturas bacterianas, cultura de tecidos de plantas e géis de eletroforese.

Agente desinfestante: Substância capaz de eliminar ou inibir o crescimento de um microrganismo na superfície de explante.

¹ Doutorando em Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA)

² Professora Adjunto, Dra., Departamento de Agricultura, UFLA

³ Professor Adjunto, PhD., Departamento de Biologia, UFLA

⁴ Professor Adjunto, Dr., Departamento de Química, UFLA.

Água deionizada: Água purificada de baixa condutividade, cujos cátions e ânions foram removidos, através da sua passagem por uma coluna de resina de troca iônica.

Água destilada: Água purificada pelo processo de destilação. A água é aquecida e seu vapor condensado em uma coluna de destilação.

AIA: (ácido indol-3-acético): Hormônio vegetal de ocorrência natural pertencentes a classe das auxinas. Induz o alongamento celular. Primeira auxina indentificada.

AIB: (ácido indol-3-butírico): Hormônio vegetal de ocorrência natural pertencentes a classe das auxinas. Induz o alongamento celular. Possui atividade enraizante.

Ambiente: Conjunto de condições externas que podem afetar o crescimento, o desenvolvimento e a reprodução de um organismo. Fatores físicos e biológicos externos que influenciam a expressão dos genes de um indivíduo.

ANA: (ácido naftalenoacético): Hormônio pertencentes a classe das auxinas que induz o alongamento celular. É mais efetivo que o AIB e AIA.

Antibiótico: Composto orgânico, geralmente produzido por microrganismos, que mata ou inibe seletivamente o crescimento de outros microrganismos. Dentre os antibióticos, têm-se as penicilinas, as cefalosporinas, os aminoglicosídeos e as tetraciclinas.

Ápice caulinar: Segmento do ápice do caule, composto pelo meristema apical (0,05 – 0,1 mm) juntamente com os primórdios foliares e folhas em desenvolvimento. A cultura de ápices caulinares é usada para eliminação de patógenos. Nesse caso, os ápices não devem exceder ao tamanho de 0,3 mm. Explantes de maior tamanho são apropriados para propagação rápida.

Assepsia: Técnica utilizadas para prevenir a introdução de fungos, bactérias, vírus, micoplasma, ou outros microrganismos em cultura de células, tecidos ou órgãos. Esse procedimento pode não excluir a introdução de moléculas infecciosas.

Autoclave: Equipamento utilizado, em geral, para esterilização de vidrarias e meios de cultura, empregando vapor de água, alta pressão (1,05 X 105 Kpa) e alta temperatura (121°C), por um determinado período de tempo.

Auxina: fitohormônio causador de expansão celular.

BAP: (6-benzilaminopurina): Hormônio pertencente a classe das citocininas que promovem a divisão e a diferenciação celular.

Biorreator: Recipiente onde ocorre uma reação biológica, em geral, fermentação ou biotransformação.

Biotecnologia: Conjunto de técnicas que utiliza seres vivos, ou parte desses, para produzir ou modificar produtos, aumentar a produtividade de plantas e animais de maneira eficiente ou, ainda, produzir microrganismos para uso específicos. A

biotecnologia inclui as tecnologias de engenharia genética, DNA recombinante, manipulação de células e embriões. Dentre os produtos biotecnológicos destacam-se a produção de insulina e de interferon a partir de genes humanos clonados e expressos em bactérias ou outros organismos heterólogos e plantas transgênicas resistentes a doenças.

Calos: Grupo ou massa de células com crescimento desordenado, as quais podem apresentar certo grau de diferenciação.

Callus: forma em latim da palavra calos.

Cinetina: regulador de crescimento com propriedades citocininas.

Citocinina: fitohormônio associado a indução de divisão celular.

Clone: População de células ou organismos geneticamente idênticos, produzidos assexualmente. Descendência que, por propagação assexual, se originou de uma única planta. População de células que possui um vetor de clonagem com o mesmo inserto. Fragmento de DNA isolado do gene de um organismo ou de um cDNA de um vetor de clonagem.

Crescimento: Aumento de massa seca ou protoplasma de um organismo, associado ao desenvolvimento. Em muitas situações, envolve divisão celular, expansão, diferenciação e morfogênese.

Criopreservação: Conservação de materiais em baixas temperaturas, próximas à temperatura do nitrogênio líquido (-196°C).

Cultura de células: Cultivo em meio nutritivo de células isoladas ou de pequenos grupos de células similares, em condições assépticas e controladas de luminosidade e temperatura.

Cultura de embriões: Refere-se aos processos de crescimento e desenvolvimento do embrião zigótico *in vitro*, independentemente da idade, tamanho e estágio de desenvolvimento em que o embrião excisado é colocado em meio de cultura.

Cultura de tecidos: Técnicas de cultura de tecidos vegetais em meio nutritivo, em condições controladas de luminosidade e temperatura.

Cultura Primária: Cultura estabelecida com um explante originado de uma planta matriz que se encontra *ex vitro*.

Desdiferenciação: Processo no qual uma célula diferenciada perde suas características específicas, reassumindo atividades meristemáticas. Por exemplo, no processo de organogênese indireta a passagem para a fase de calos é um processo de desdiferenciação, no qual as células perdem sua identidade original e assumem características mais simples.

Desenvolvimento: Crescimento integrado de um organismo pluricelular ou parte dele, associado a mudanças na forma e na complexidade, por padrões sucessivos de diferenciação e morfogênese.

Desinfestação: Eliminação de microrganismos superficiais presentes em um explante com o uso de substâncias como o hipoclorito de sódio ou cálcio, álcool, cloreto de mercúrio, etc.

Diferenciação: Mudanças fisiológicas, morfológicas, bioquímicas e anatômicas que ocorrem em um célula, tecido, órgão ou planta, durante o desenvolvimento do estado meristemático ou juvenil para o adulto. As células do embrião e do meristema apical servem de exemplo do estado indiferenciado.

2ip (isopenteniladenina): Hormônio vegetal pertencente a classe das citocininas, de ocorrência natural. Foi descoberta na bactéria *Corynebacterium fascians*. A alta atividade fisiológica está relacionada à divisão e diferenciação celular.

2,4-D (ácido 2,4 diclofenoxiacético): Auxina sintética altamente ativa que promove a organogênese, sendo mais frequentemente empregada para iniciar a cultura de calos. Apresenta propriedade herbicida.

Dormência: Condição em que o crescimento é suspenso ou reduzido por controle endógeno, mesmo quando as condições ambientais são favoráveis. Ocorre em órgãos de reserva (bulbos e tubérculos), em gemas e em sementes, entre outros órgãos vegetais. Uma semente viável é considerada dormente quando não germina ao ser submetida a condições favoráveis de germinação (temperatura, água, oxigênio e específicos que quebrem a dormência).

Embrião: Planta rudimentar formada dentro do gametófito feminino, que possui um eixo polar com um ápice caulinar e um radicular em extremidades opostas. Origina-se da união do óvulo com o núcleo espermatóico.

Embrião somático: Embrião formado a partir de células somáticas seguindo padrões de desenvolvimento do embrião zigótico.

Embriogênese somática: Processo de formação do embrião a partir de células somáticas, sem que ocorra fusão de gametas, podendo ser direta e indireta.

Embriogênese somática direta: Processo de embriogênese somática que ocorre sem a passagem pelo estágio de calo.

Embriogênese somática indireta: Processo de embriogênese somática que ocorre com a passagem pelo estágio de calo.

Embrióide: Sinônimo de embrião somático.

Explante: Segmento de tecido ou órgão vegetal retirado do seu sítio natural e utilizado para iniciar uma cultura *in vitro*.

Ex situ: Fora do lugar original

Ex vitro: Literalmente 'fora do vidro'. Termo normalmente utilizado para contrastar com processos efetuados *in vitro*.

Etileno: Fitohormônio associado com o amadurecimento de frutos.

Fitohormônio: Substância orgânica produzida pela planta, de baixa massa

molecular que, em pequenas concentrações, promove, inibe ou modifica processos fisiológicos, geralmente em locais diferentes daquele onde foi produzida.

Flambagem: Ato de esterilizar instrumentos, expondo-os à chama.

Fluxo laminar: Fluxo de uma massa contínua de ar ultrafiltrado (através de um filtro HEPA), livre e constante, no sentido unidirecional e aerodinâmico, ao longo de linhas paralelas, sem criar turbulência. Esse fluxo de ar toma a forma dos objetos ou pessoas que encontra no trajeto, envolvendo-as em uma atmosfera estéril, carregando, ao mesmo tempo, as contaminações geradas dentro da área de trabalho. O fluxo pode ser horizontal ou vertical.

Friabilidade: Capacidade das células vegetais se separarem uma das outras, quando cultivadas *in vitro*. Por exemplo, calos mantidos em meios com altas concentrações de auxinas, em geral, se tornam friáveis.

Fusão de protoplastos: União de células desprovidas de parede celular resultando em uma célula híbrida com material nuclear das diferentes células de origem.

GA₃ (ácido giberélico): Hormônio pertencente a classe das giberelinas que induz a germinação.

Germinação: Engloba todos os eventos que iniciam pela absorção de água de uma semente e, na maioria das vezes, termina com a emissão da radícula.

Germoplasma: Material hereditário que determina a característica de um organismo ou de um grupo de organismos.

Giberelina: fitohormônio estimulador de germinação.

Habituação: Habilidade adquirida por uma população de células de crescer e de se dividir independentemente do suprimento exógeno de substâncias reguladoras de crescimento.

Hiperhidricidade: Veja vitrificação.

Hormônio: Mensageiro químico que coordena diferentes atividades em organismos multicelulares.

Indiferenciado: Em células vegetais, estado caracterizado por células de forma isodiamétrica, com pouco ou nenhum vacúolo e núcleo grande. Como exemplo tem-se as células meristemáticas.

Indução: Desencadeamento de um processo morfogênico pela exposição do explante a estímulos físicos, químicos ou biológicos. Indução envolve o controle da expressão gênica, sem alteração no patrimônio genético de organismo, ou seja, esse termo se refere somente à expressão de genes preexistentes.

Inoculação: Introdução de bactéria, fungo, parte da planta ou células animais em meio nutritivo, para o estabelecimento da cultura. Introdução de microrganismos em animais ou vegetais.

In situ: No lugar original.

In vitro: Literalmente 'no vidro'. Termo aplicado para designar crescimento de células, tecidos ou órgãos vegetais em meio de cultura, em condições assépticas.

In vivo: Literalmente 'ao vivo'. Refere-se ao desenvolvimento de organismos vivos, em condições naturais.

Juvenildade: Estado fisiológico do desenvolvimento caracterizado pela incapacidade de florescimento mesmo quando a planta é exposta a condições indutoras. Às vezes, é acompanhado por diferenças morfológicas (tamanho, forma ou disposição de folhas; presença de espinhos etc.) e fisiológicas (maior capacidade de enraizamento de estacas). É a fase do crescimento, após a germinação da semente.

Meio nutritivo: Combinação de sais minerais (macro e micronutrientes), carboidrato, vitaminas e reguladores de crescimento, quimicamente definido e utilizado para o crescimento de células, tecidos ou órgãos *in vitro*. Pode ser sólido (adicionando-se ágar ou outro agente para a gelificação) ou líquido.

Meristema: Tecido composto de células não diferenciadas, envolvido na síntese protoplásmica e formação de novas células por divisão mitótica. Quando não há especificação, o termo se refere ao meristema apical do caule com tamanho menor que 0,1 mm.

Microenxertia: Forma de propagação assexuada *in vitro* que consiste em excisar parte de uma planta (ápice caulinar ou gema lateral) e introduzi-la em outra planta (porta-enxerto) também estabelecida *in vitro*.

Micropropagação: Refere-se às técnicas para propagação de plantas *in vitro*, incluindo-se, cultura de ápices caulinares e segmentos nodais, embriogênese somática e formação de gemas adventícias em explantes.

Mutagênese *in vitro*: Qualquer processo de mutação induzida realizado *in vitro*.

Necrose: Morte de células ou tecidos, em totalidade ou em parte, resultante da ação de agentes bióticos ou abióticos.

Organogênese: Processo de neoformação de parte aérea ou raiz a partir de calo ou de outros explantes; contrasta com embriogênese.

Organogênese direta: Organogênese em que não ocorre passagem pela fase de calo.

Organogênese indireta: Organogênese que passa pela fase de calo.

Oxidação: Escurecimento do meio de cultura e ou explante ocasionado por compostos (a maioria fenólicos) liberados pelo explante.

Quiescência: Inibição da germinação devido a algum fator ambiental desfavorável.

Propagação *in vitro*: Propagação de plantas em ambiente controlado, usando frasco de cultura, técnicas assépticas e um meio nutritivo adequado para o crescimento e o desenvolvimento do explante inoculado.

Regeneração: Em cultura de tecidos de plantas, significa uma resposta morfogênica de um explante a um estímulo, que resulta na formação de parte aérea, embrião, propágulo ou planta. Nesse processo, células diferenciadas sofrem desdiferenciação, assumindo características meristemáticas e, em seguida, são reprogramadas, diferenciando-se em órgãos especializados (rediferenciação). A regeneração pode ocorrer via organogênese ou embriogênese.

Regeneração adventícia: Regeneração de um órgão vegetal em uma região diferente daquela onde originalmente é formado.

Regulador de crescimento: Substâncias sintéticas, não produzidas naturalmente que, quando aplicadas à planta em quantidades diminutas, estimulam, inibem ou modificam o crescimento ou o desenvolvimento (efeitos semelhantes aos dos fitohormônios). Muitas dessas substâncias são quimicamente análogas aos fitohormônios.

Repicagem: Transferência de calos ou material vegetal em cultivo, sem subdividi-lo, para um novo meio nutritivo.

Resgate de embriões: Processo de recuperação *in vitro* de embriões resultantes de cruzamentos incompatíveis. Em geral, é realizado mediante cultura de embriões.

Subcultura: Cultura de tecido constituído na subdivisão de material já estabelecido *in vitro*, sua transferência para novo meio, e a incubação subsequente em condições controladas.

Suspensão celular: cultura de células ou agregados celulares em meio líquido, frequentemente sob agitação.

Taxa de multiplicação: Número de propágulos obtidos a partir de um explante inicial, em um determinado período de tempo.

TDZ (thidiazuron): Hormônio pertencente a classe das feniluréias, ativamente ligadas na promoção de crescimento de calos e morfogênese.

Totipotência: Propriedade inerente às células vegetais de manifestar, em momentos diferentes e sob estímulos apropriados, a potencialidade em iniciar um novo indivíduo multicelular.

Ultravioleta: Radiação eletromagnética com comprimento de onda entre 290 e 389 nm. Geralmente, é empregada na indução de mutações em microrganismos ou na desinfestação de materiais utilizados em cultura de tecidos vegetais. Em biologia molecular, é utilizada para a visualização de ácidos nucléicos corados com brometo de etídeo.

Varição somaclonal: Variação espontânea ocorrida em plantas regeneradas de cultivo *in vitro* de células ou tecidos.

Vitrificação: Refere-se a um processo no qual um propágulo se torna quebradiço, com aspecto de vidro, provavelmente ocasionado pela absorção

excessiva de água, processo esse atribuído a diversos fatores (genótipo, composição do meio, etc). Anteriormente este processo era denominado de hiperhidricidade.

ZEA (zeatina): Hormônio vegetal pertencente a classe das citocininas, de ocorrência natural, especialmente, em grãos imaturos de milho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMMIRATO, P.G.V. Embriogenesis. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (eds.). **Handbook of plant cell culture**. New York: MacMillan Publisher Companh, v.1, 1983. 123p.
- BAJAJ, Y.P.S. Regeneration of plants from ultra-low frozen anthers of *Primula obconica*. **Scientia Horticulturae**, v.14, n.1, p.93-95, 1986.
- BALL, E. Hydrolysis of sucrose by autoclaving media, a neglected aspected in the technique of culture of plant tissue. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v.80, p.409-11, 1953.
- BROWSE, P.M. **A propagação de plantas**. 3.ed. Lisboa: Europa-América, 1979. 229p.
- CALDAS, L.; HARIDASSAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. e BUSO, J.A. (eds.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, v.1. 1998. p.87-132.
- CALDAS, L.; HARIDASSAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (eds.). **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas**. Brasília: Imprensa Nacional. 1990, 433p.
- CÉSAR, H.P. **Manual prático do enxertador**. 9.ed. São Paulo: Nobel, 1978. 158p.
- CID, L.P.B. Suspensão celular. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, v.1. 1998. p.331-353.
- CORRÉA JÚNIOR; MING, L.C.; SCHEFFER, M.C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**, 2.ed. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 162p.
- COSTA, M.M.C. Fisiologia da aclimatização. In: TOMBOLATO, A.F.C.; COSTA, M.M.C. (coords.) **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, 1998, p. 63-7. (Boletim técnico, 174).
- DALTON, C.C.; IQBAL, K.; TURNER, D.A. Iron phosphate precipitation in Murashige e Skoog media. **Physiologia Plantarum**, v.57, p.472-6, 1983.
-

- DEBERG, P.C.; MAENE, L.V. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.14, p.335-345, 1981.
- DEKHUIJZEN, H.M. Sterilization of cytokinins. In: VAN BRAGT, J.; MOSSEL, D.A.A.; PIERIK, R.L.M.; VELDSTRA, H. (eds.): **Effects of Sterilization on Components in Nutrient Media**. Wageningen: H. Veenmam, 1971. p.129-33.
- DIXON, R.A. Isolation and maintenance of callus and cell suspension cultures. In: DIXON, R.A., (ed.) **Plant cell culture: a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1985. p.1-20.
- DRIESSEN, A.C.; SOUZA FILHO, J.J.C. de. Produção de mudas. In: EMPRESA CATARINENSE DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Manual da Cultura da Macieira**. Florianópolis: EMPASC, p.202-223, 1986.
- FACHINELLO, J.C.; HOFFMAN, A.; NACHTIGAL, J.C.; et al. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2.ed. Pelotas: Editora UFPEL, 1995. 179p.
- FACHINELLO, J.C.; KERSTEN, E.; MACHADO, A.A. Efeito do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas lenhosas de pessegueiro cv. Diamante. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.17, n.2, p.247-252, 1982.
- FRANKELL, O.H.; BROWN, A.H.D.; BURDON, J.J. **The Conservation of Plant Biodiversity**. Cambridge: University Press, 299p. 1995.
- FUJIMURA, T.; KOMAMINE, A. Involvement of endogenous auxin in somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. **Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie**, v.95, p.13-9, 1979.
- GAMBORG, O.L. Media preparation. **Plant Tissue Culture Manual**. v.A1, p.1-24, 1991.
- GAMBORG, O.L.; MURASHIGE, T.; THORP, T.A.; VASIL, I.K. Plant Tissue Culture Media. **In vitro**, v.12, n.7, p.473-8. 1976.
- GARNER, R.J. **Manual del injertador**. Madrid: Mundi-Prensa, 1987. 325p.
- GAUTHERET, R.J. Investigations of the root formation in the tissues of *Helianthus tuberosus* cultured *in vitro*. **American Journal of Botany**, v.56, p.702-12, 1969.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. Part 2, In Practice. London: Exegetics Limited, (2.ed.), 1996. 574p.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. Part 1. The technology., London: Exegetics Limited, (2.ed.), 1993. 574p.
-

- GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. *Plant propagation by tissue culture: Handbook and directory of commercial Laboratories*. Basingstoke: Exegetics Limited, London, 1984. 709p.
- GOMES, G.A.C. *Propagação in vitro de moreira (Maclura tinctoria)*. Lavras: UFLA, 1999. p.92. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (eds.). *Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas*. Brasília: Embrapa/CNPq, 1990, p.99-169.
- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES, F.D.; GENEVE, R.L. *Plant propagation: principles and practices*. 6.ed. New Jersey: Prentice-Hall Inc., 770p, 1997.
- HUANG, LI-CHUM; MURASHIGE, T. Plant tissue media: major constituents, their preparation and some applications. *TCA Manual*. v.3, cap.1, p.539-48, 1976.
- JANICK, J. *A ciência da horticultura*. Rio de Janeiro: USAID, 1966. 485p.
- KAMADA, H.; HARADA, H.. Studies on the organogenesis in carrot tissue culture. II. Effects of amino acids and inorganic nitrogenous compounds on somatic embryogenesis. *Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie*. v.91, p.453-63, 1979.
- KOZAI, T.A. Acclimatization of micropropagated plants: biotechnology in agriculture and forestry. In: BAJAJ, Y.P.S. (ed). *High-Tech and micropropagation*. Berlin: Springer-Verlag, 1991, v.17, p.127-42.
- LEES, R.P. Effects of the light environment on photosynthesis and growth *in vitro*. In: LUMSDEN, P.J.; NICHOLAS, J.R.; DAVIES, W.J. (eds.) *Physiology, growth and development of plant tissue culture*. New York: Elsevier/North Holland, p.31-46, 1993.
- LOEWUS, F.A.; LOEWUS, M.W. Myo-inositol: its biosynthesis and metabolism. *Annual Review of Plant Physiology*. v.34, p.137-61, 1983.
- 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.344.
- MARGARA, J. Étude des facteurs de la néoformation de bourgeons en culture *in vitro* chez le chou-fleur (*Brassica oleracea* L. var. Botrytis). *Annals of Physiology Vegetable*. v. 11, p.95-112, 1969.
- McDONALD, B. *Practical woody plant propagation for nursery growers*. Portland: Timber Press, USA. 1996. 669p. il.
-

- MOSSEL, D.A.A.; PIERIK, R.L.; VELDSTRA, H. (eds): **Effects of sterilization on components in nutrient media**. Wageningen: Knipphorst Scientific Bookshoop, 1971. 354p.
- MURASHIGE, T. Manipulation of organ initiation in plant culture. **Botanical Bulletin Academic Sinica**, v.18, p.1-24, 1977.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review of Plant Physiology**, v.25, p.135-66, 1974.
- MURASHIGE, T. Sample preparations of media. In: KRUSE, P.F.; PATTERSON JR., N.K. (eds.). **Tissue Culture Methods and Applications**. New York: Academic Press. p.698-703, 1973.
- MURASHIGE, T. The role of gibberellin in shoot differentiation in tobacco tissue culture. In: WHITE, P.R.; GROVE, A.R. (eds.). **Plant Tissue Culture**. Berkeley: McCutchan Pub. Corp., 1963. p.401-9.
- MURASHIGE, T.; SKOOGS, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-97, 1962.
- NABORS, M.W.; HEYSER, J.W.; DRYKES, T.A.; DeMOTT, K.J. Long-duration, high-frequency plant regeneration from cereal tissue culture. **Planta**, v.57; p.385-91, 1983.
- PASSOS, E.F.; VENTURA, P.C.S. **Física (Ótica)**. Viçosa: Imprensa Universitária, Universidade Federal de Viçosa, 1979, 20p.
- PAIVA, R. **Fisiologia Vegetal**. Lavras:UFLA/FAEPE, 69p. 2000.
- PAIVA, R. **Fisiologia de Plantas Ornamentais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 82p.,2000.
- PEER, H.G. Degradation of sugars and their reactions with amino acids. In: VAN BRAGT, J.; MOSSEL, D.A.A.; PIERIK, R.L.M.; VELDSTRA, H. (eds.): **Effects of Sterilization on Components in Nutrient Media**. Wageningen: H. Veenmam, 1971. p.105-13.
- PIERIK, R.L.M. **In vitro culture of higher plants**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 344p, 1987.
- POSTHUMUS, A.C. Auxins. In: VAN BRAGT, J.; MOSSEL, D.A.A.; PIERIK, R.L.M.; VELDSTRA, H. (eds.): **Effects of sterilization on components in nutrient media**. Wageningen: H. Veenmam, p.125-28, 1971.
-

- PREECE, J.E.; SUTTER, E.G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (eds.). **Micropropagation**. Wageningen: Kluwer Academic Publishers., 1991, p.71-93.
- RHODES, J.M.; WOOLTORTON, L.S.C. The biosynthesis of phenolic compounds in wounded plant storage tissue. In: KAHL, G. (ed.). **Biochemistry of wounded plant tissue**. Berlin-New York: Gurtyer & Co., 1978. 458p.
- SHIZUTTO, M. **Fruticultura**, 2.ed. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1994. 428p.
- SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation growth and organ formation in plant tissues cultivated *in vitro*. In: **Biological Action of Growth Substances**. Symposium of Society Experimental Biology, 11. p.118-131, 1957.
- SMITH, H. Light quality, photoperception and plant strategy. **Annual Review of Plant Physiology**. v.33, p.481-518, 1982.
- SMITH, R.H. **Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments**. San Diego: Academic Press, 1992, 171p.
- STENPAN-SARKISSIAN, G. Selection of media for tissue and cell culture. In: POLLARD, J.W.; WALKER, J.M. (eds.). **Plant Cell and Tissue Culture**. New Jersey: Human Press, 1990, 597p.
- STREET, H.E. Nutrition and metabolism of plant tissue culture. **Journal National of Cancer Institute**. v.19; p.467-85, 1957.
- TENLTAM, E.J. Vitamins. In: VAN BRAGT, J.; MOSSEL, D.A.A.; PIERIK, R.L.M.; VELDSTRA, H. (eds.): **Effects of Sterilization on Components in Nutrient Media**. Wageningen: H. Veenmam, p.121-23, 1971.
- THOMPSON, P. **Creative propagation, a grower's guide**. Portland: Timber Press, USA. 1999. 220p.
- THURSTON, K.C.; SPENCER, S.J; ARDITTI, J. Phytotoxicity of fungicides and bactericides in orchid culture media. **American Journal of Botany**, v.66; cap.7; p.825-35, 1979.
- TOMBOLATO, A.F.C.; COSTA, A.M.M. Micropropagação de plantas ornamentais. Campinas, Instituto Agrônômico, 1998. 72p. (**Boletim técnico**, 174).
- TORRES A.C.; CALDAS L.S. (eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPH, 1990. 433p.
- TORRES A.C.; FERREIRA A.T.; SÁ F.G.; et al. **Glossário de Biotecnologia Vegetal**. Brasília: Embrapa/CNPH, 2000. 128 p.
-

- TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, v.1, 509p, 1998.
- TORRES, A.C. **Tissue culture techniques for horticultural crops**. New York: Van Nostrand Peenhold. 1989, p.60-65.
- VAN BRAGT, J.; PIERIK, R.L.M. The effect of autoclaving on the gibberellins activity of aqueous solutions containing gibberellins A₃. In: VAN BRAGT, J.; MOSSEL, D.A.A.; PIERIK, R.L.M.; VELDSTRA, H. (eds.): **Effects of Sterilization on Components in Nutrient Media**. Wageningen: H. Veenman, 1971. p.125-33.
- VINCE-PRUE, D. Photomorphogenesis and plant development. In: LUMSDEN, P.J.; NICHOLAS, J.R.; DAVIES, W.J. (eds.). **Physiology, growth and development of plant tissue culture**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1993. p.19-30.
- WAREING, P. F. Determination and related aspects of plant development. In: SMITH, H.; GRIERSON, E.D. (eds.). **The Molecular Biology of Plant Development**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, p. 517-39, 1982.
- WESTWOOD, M.N. **Fruticultura de zonas templadas**. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 1982. 461p.
- YAMAKAWA, T.; KURAHASHI, O.; ISHIDA, K.; et al. Stability of indole-3-acetic acid to autoclaving aeration and light illumination. **Agricultural Biology of Chemistry**, v.43; p.879-80, 1979.
-