

Cultivo *in vitro* e suas aplicações:

- **Histórico:**

- princípios da totipotência no século XIX
- Haberlandt (1902): cultivo de tecidos somáticos de
- Hannig (1904): cultivo embriões imaturos de crucíferas
- Knudson (1922): embriões de orquídeas
- Laibach (1925): recuperação embriões híbridos incompatíveis de *Linum*
- White (1934): elaborou meio líquido para o cultivo sais inorgânicos, sacarose e extrato de levedura,
- Murashige & Skoog (1962): meio MS, níveis nutrientes inorgânicos baseados constituição extrato folhas fumo
- descobrimento e a utilização de fitormônios e funções dos nutrientes vitamínicos e inorgânicos

Tabela 1. Composição dos meios White, MS e B5. MS = Murashige & Skoog (1962), B5 = Gamborg et al. (1968), White = o meio de White evoluiu ao longo dos anos, desde 1932 até 1963. Esta formulação é basicamente a de 1943, com acréscimo de Cu e Mo.

	Concentrações dos componentes					
	Meio de White		Meio MS		Meio B5	
	mg.L ⁻¹	mmol.L ⁻¹	mg.L ⁻¹	mmol.L ⁻¹	mg.L ⁻¹	mmol.L ⁻¹
Macronutrientes						
Ca(NO ₃) ₂ .4 H ₂ O	300	1,27	-	-	-	-
NH ₄ NO ₃	-	-	1.650	20,6	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	-	-	134	1,01
KNO ₃	80	0,79	1.900	18,8	2.500	24,7
CaCl ₂ .2 H ₂ O	-	-	440	3,0	150	1,02
MgSO ₄ .7 H ₂ O	720	2,92	370	1,5	250	1,01
KH ₂ PO ₄	-	-	170	1,25	-	-
KCl	65	0,87	-	-	-	-
Na ₂ SO ₄	200	1,41	-	-	-	-
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	16,5	0,12	-	-	150	1,05
Micronutrientes						
MnSO ₄ .4 H ₂ O	5,3	0,031	22,3	0,100	-	-
MnSO ₄ .H ₂ O	-	-	-	-	10	0,06
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	3,0	0,010	8,6	0,030	2,0	0,007
H ₃ BO ₃	1,5	0,024	6,2	0,100	3,0	0,048
KI	0,75	0,0045	0,83	0,005	0,75	0,0045
MoO ₃	0,01	0,000007	-	-	-	-
Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O	-	-	0,25	0,001	0,25	0,001
CuSO ₄ .5 H ₂ O	0,010	0,00004	0,025	0,0001	0,025	0,0001
CoCl ₂ .6 H ₂ O	-	-	0,025	0,0001	0,025	0,0001
FeEDTA						
Na ₂ EDTA.2 H ₂ O	-	-	37,3	0,100	*	0,050
FeSO ₄ .7 H ₂ O	-	-	27,8	0,100	*	0,050
Fe ₂ (SO ₄) ₃	2,5	0,0062	-	-	-	-

* A formulação usa a preparação comercial Sequestrene.

Tabela 2. Principais fitorreguladores utilizados em cultura de tecidos de plantas.

Classe de fitorreguladores	Abreviatura	P.M.
Auxinas		
01. Ácido 3-indolilacético	AIA	175,20
02. Ácido 3-indolilbutírico	AIB	203,23
03. Ácido α -naftalenoacético	ANA	186,20
04. Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	2,4-D	221,04
05. Ácido 4-clorofenoxiacético	4-CPA	184,50
06. Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico	Picloram	241,46
07. Ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético	2,4,5-T	255,49
08. Ácido naftoxiacético	NOA	202,21
Citocininas		
09. 6-furfurilaminopurina ou Cinetina	Cin	215,20
10. 6-benzilaminopurina ou 6-benziladenina	BA, BAP	225,20
11. N ⁶ - (4-hidroxi-3-metilbut-2enil) aminopurina ou Zeatina	Zea	219,20
12. (6-benzilamino)-9-(2-tetrahidropiranyl) 9H-purina	PBA	300,00
13. N ⁶ -(2-isopentenil)-adenina ou Isopenteniladenina	2ip	203,30
14. Thidiazuron (1-fenil-3-(1,2,3-thiadiazol-5il) uréia	TDZ	220,20
Giberelinas		
15. Ácido giberélico	GA ₃	346,40
Outros		
16. Ácido 2-(cloroetil) fosfônico ou Ethephon ou Ethrel	CEPA	144,50
17. Ácido abscísico	ABA	264,31

Table 3

CHARACTERISTICS OF IMPORTANT PLANT GROWTH REGULATORS AND HORMONES. THOSE MARKED WITH ASTERISK (*) OCCUR NATURALLY

Name	Chemical name	Mol. Wt.	Solvent	Sterilization ¹	Storage	
					Powder	Liquid
A. Auxins						
IAA*	indole-3-acetic acid	175.2	EtOH or 1N NaOH	CA/F	-0°C	-0°C
IBA*	indole-3-butyric acid	203.2	EtOH or 1N NaOH	CA/F	0-5°C	-0°C
K-IBA	indole-3-butyric acid-potassium salt	241.3	Water	CA/F	0-5°C	-0°C
NAA	α -naphthaleneacetic acid	186.2	EtOH or 1N NaOH	CA	RT	0-5°C
2,4-D	2,4-dichloro-phenoxy-acetic acid	221.0	EtOH or 1N NaOH	CA	RT	0-5°C
B. Cytokinins						
BA	6-benzyl-amino-purine	225.3	1N NaOH	CA/F	RT	0-5°C
2iP*	6(di-methyl-allyl-amino) purine	203.2	1N NaOH	CA/F	-0°C	-0°C
Kinetin		215.2	1N NaOH	CA/F	-0°C	-0°C
TDZ	Thidiazuron	220.2	DMSO or EthOH	CA	RT	0-5°C
Zeatin*		219.2	1N NaOH	CA/F	-0°C	-0°C
C. Gibberellins						
GA ₃ *	gibberellic acid	346.4	EtOH	F	RT	0-5°C
K-GA ₃	gibberellic acid potassium salt	384.5	water	F	0-5°C	-0°C
D. Inhibitors						
ABA*	Abscisic acid	264.3	1N NaOH	CA/F	-0°C	-0°C

¹CA = autoclavable with other media; F = filter sterilize; CA/F = autoclavable with other components but some loss in activity may occur.

Source: Adapted from Plant Cell Culture 1993 catalog. Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.











(a)

(b)

(c)

Figure 10

The temporary immersion bioreactor system uses pumps and filters to immerse tissue in nutrient medium for short durations before draining away. (a) Culture prior to immersion. (b) Liquid being pumped over the culture. (c) Liquid being reversed back to the reservoir.



(a)

(b)

(c)

Figure 11

Tissue overlay (also called double phase) culture. (a) Liquid medium being added over the shoot. (b) Explant submerged in liquid medium. (c) Overlay containing activated charcoal.



(a)



(b)



(c)



(d)

Figure 6

The culture growing area has lighted stainless steel racks that hold the culture vessels. (a) Technician checking on culture progress. (b) Racks containing test tubes. (c) Racks with orchids in Erlenmeyer flasks. (d) Cultures in Magenta jars.

- **Aplicações:**
 - propagação em larga escala, preservação de recursos e melhoramento genético
 - limpeza de viroses e outros agentes fitopatogênicos
- **Produção comercial:**
 - Biofábricas:
 - seleção e desinfestação, estabelecimento, multiplicação, enraizamento e aclimatação
 - Europa, EUA e Ásia
 - ornamentais, frutíferas, essências florestais, olerícolas
 - Brasil: década de 60 (USP)
 - Bioplanta, Biomatrix, Multiplanta, Holambra
- **Variações *in vitro*:**
 - somaclonais: estresses induzidos no sistema
 - produção de novas cultivares:
 - tomate “DNAO 9” - elevado teor de sólidos solúveis
 - pimentão “Bell Sweet” - menor número de sementes

- **Origem das variações somaclonais:**

- separação dos cromossomos mitoses
- alterações na seqüência de nucleotídios do DNA
- podem ser induzidas:
 - substâncias mutagênicas
 - raios UV

- **Fusão de protoplastos:**

- célula vegetal individualizada e desprovida de parede
- ação de enzimas pectnocelulolíticas
- seleção in vitro
- redução nos riscos de quimeras
- produção de híbridos somáticos
 - eliminação de barreiras pré- e pós-zigóticas
- indução de fusão:
 - choques elétricos, eletro fusão, polietileno glicol

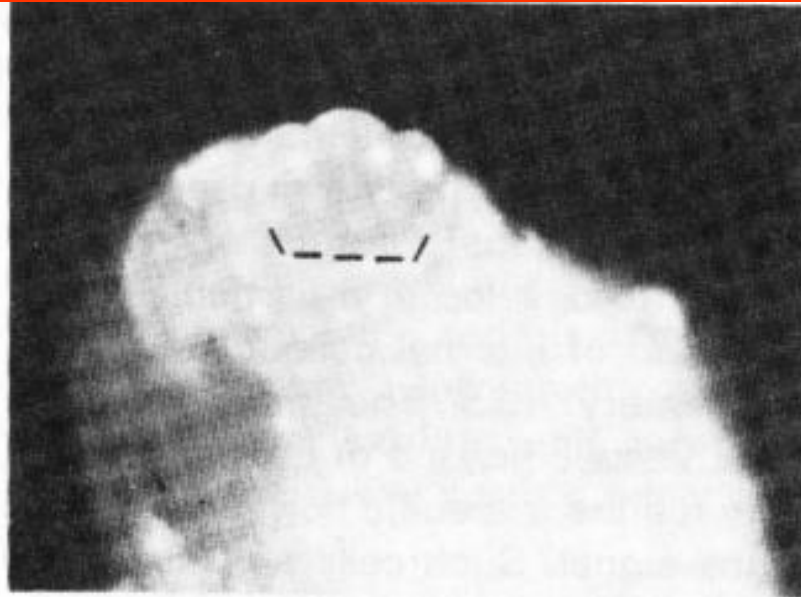


FIGURE 16-1 Shoot tip of carnation stem with outer leaves removed, showing the apical and lateral meristems (growing points). Part of shoot tip to be excised for culturing is indicated by lines. (Courtesy W. P. Hackett.)

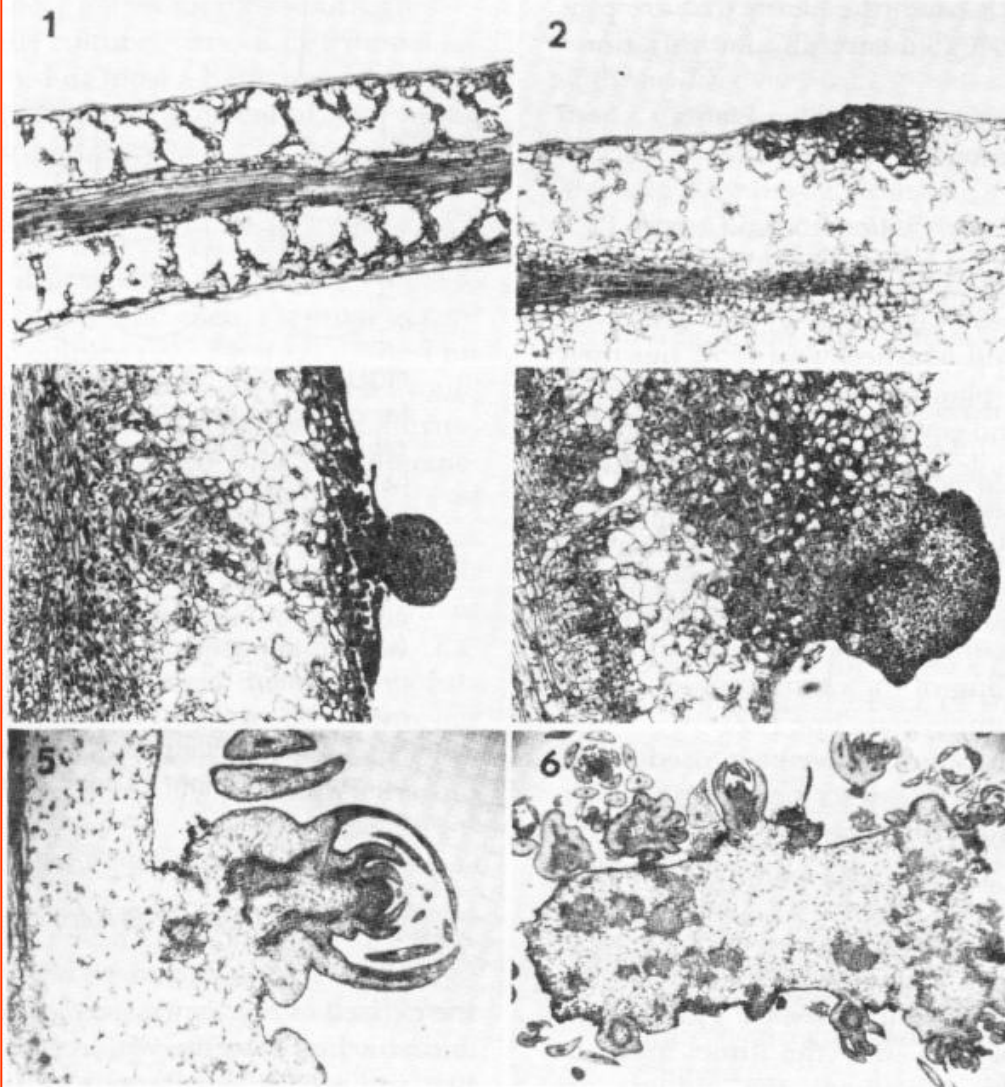
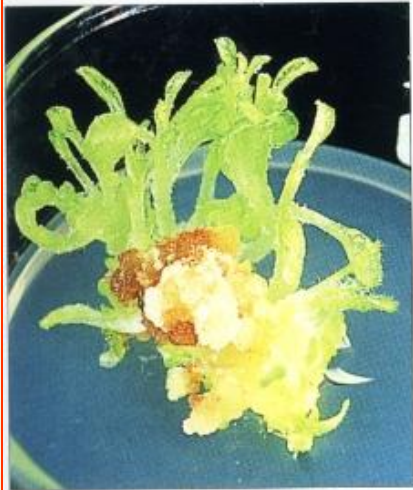


FIGURE 16-6 Adventitious shoot initiation on Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) cotyledons. *Top left:* Cross section of cotyledon before culture. *Top right:* Initiation of a meristemoid on surface of cotyledon. *Center left:* Development of meristemoid into a tiny globular mass of tissue. *Center right:* Differentiation into a shoot primordium. *Lower left:* A completely developed shoot tip. *Lower right:* Cotyledon showing masses of adventitious shoot tips. (Courtesy Dr. Tsai-Ying Cheng.)

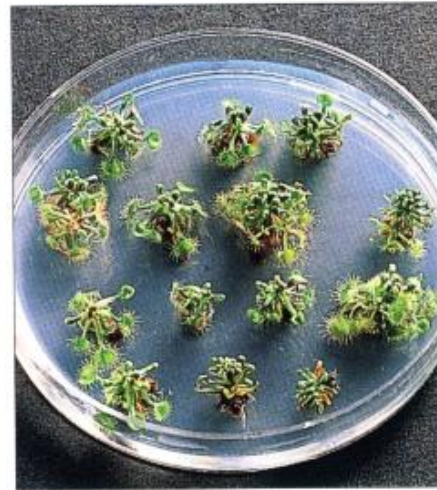
MICROPROPAGACIÓN A PARTIR DE CÉLULAS



TEJIDO DE PLANTA CULTIVADO Las células de la planta crecen en un gel de nutrientes hasta que la masa celular produce plantas embrionarias.



ESQUEJES DE TEJIDO CULTIVADO La masa de tejido vegetal se divide en fragmentos, cada uno con un embrión, y se pasa a un medio de enraizamiento.



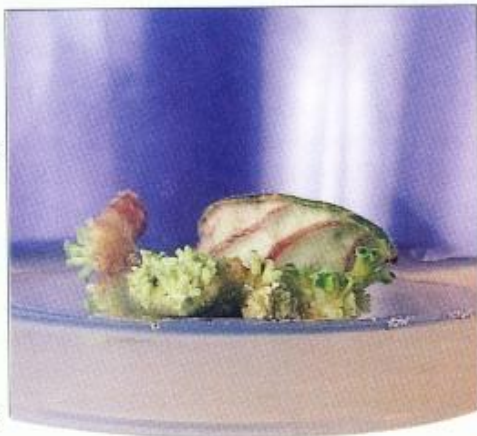
PLÁNTULAS ENRAIZADAS Las hormonas del gel de nutrientes favorecen el desarrollo de raíces y hojas en las plántulas (en este caso rosolis).



PLANTAS JÓVENES Las plántulas se desarrollan en frascos precintados y estériles hasta que alcanzan el tamaño suficiente para trasplantarlas.

OTRAS FORMAS DE MICROPROPAGACIÓN

Las condiciones estériles de micropropagación pueden utilizarse para obtener mejores cosechas y preservarlas de enfermedades, adaptando los métodos ya utilizados para incrementar el número de plantas. Las plántulas se desarrollan a partir de esquejes foliares delgados; los microtubérculos pueden transportarse fácilmente; por último, las semillas de orquídea presentan un grado de supervivencia mucho mejor si se protegen de las bacterias ambientales.



ESQUEJE FOLIAR DE VIOLETA AFRICANA



MICROTUBÉRCULOS DE PATATA



PLÁNTULAS DE ORQUÍDEA

Foto: Arquivo Embrapa Hortaliças

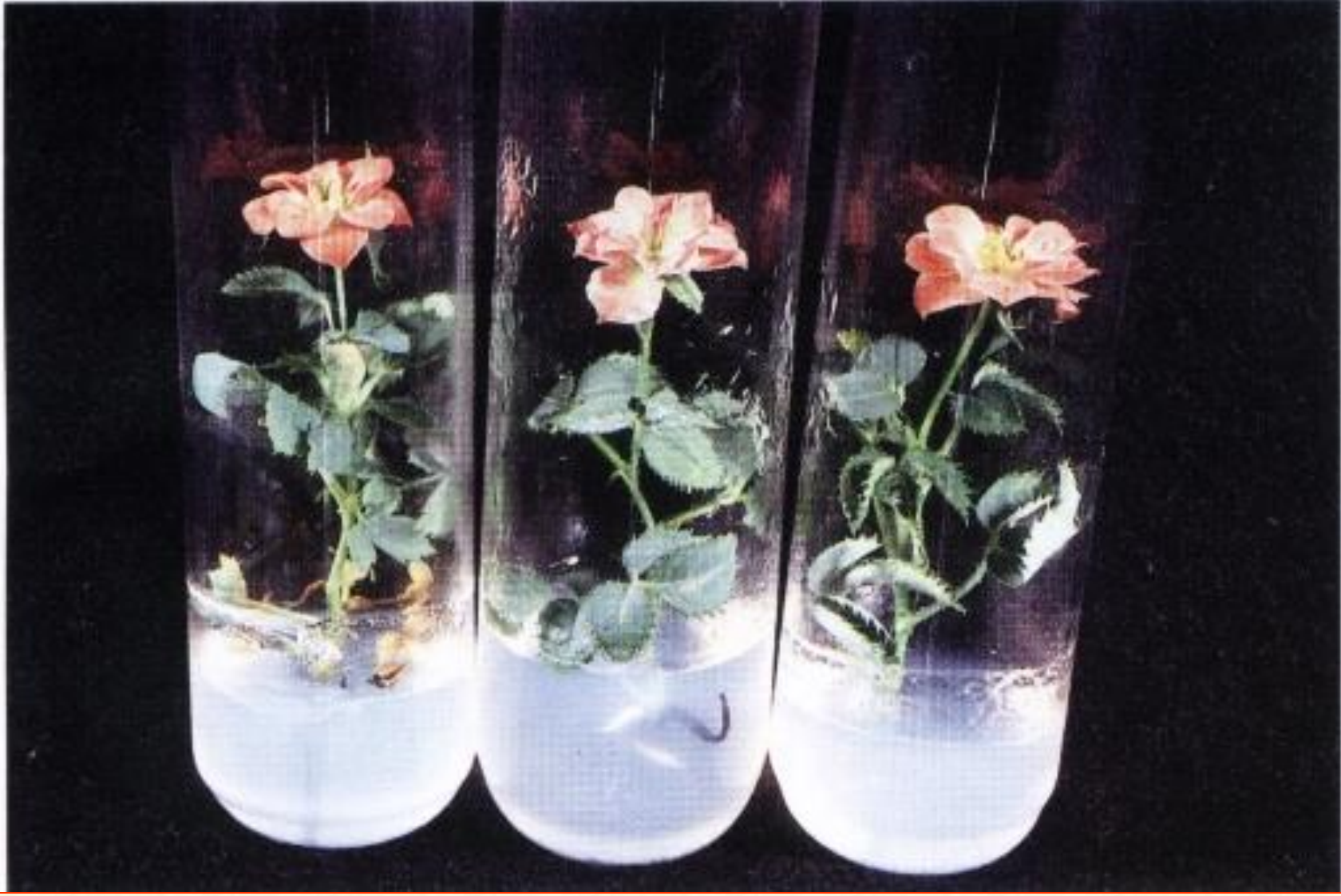
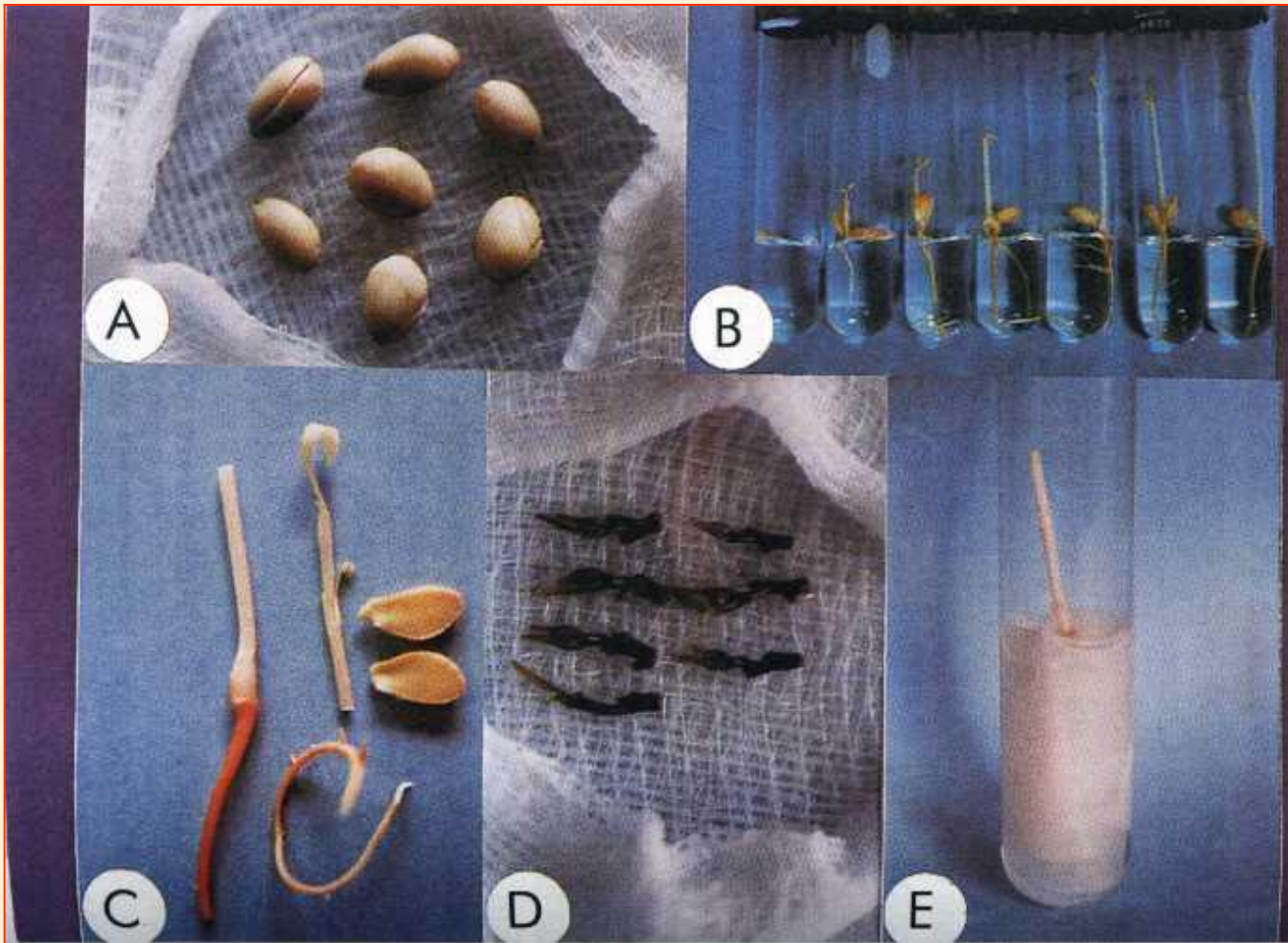
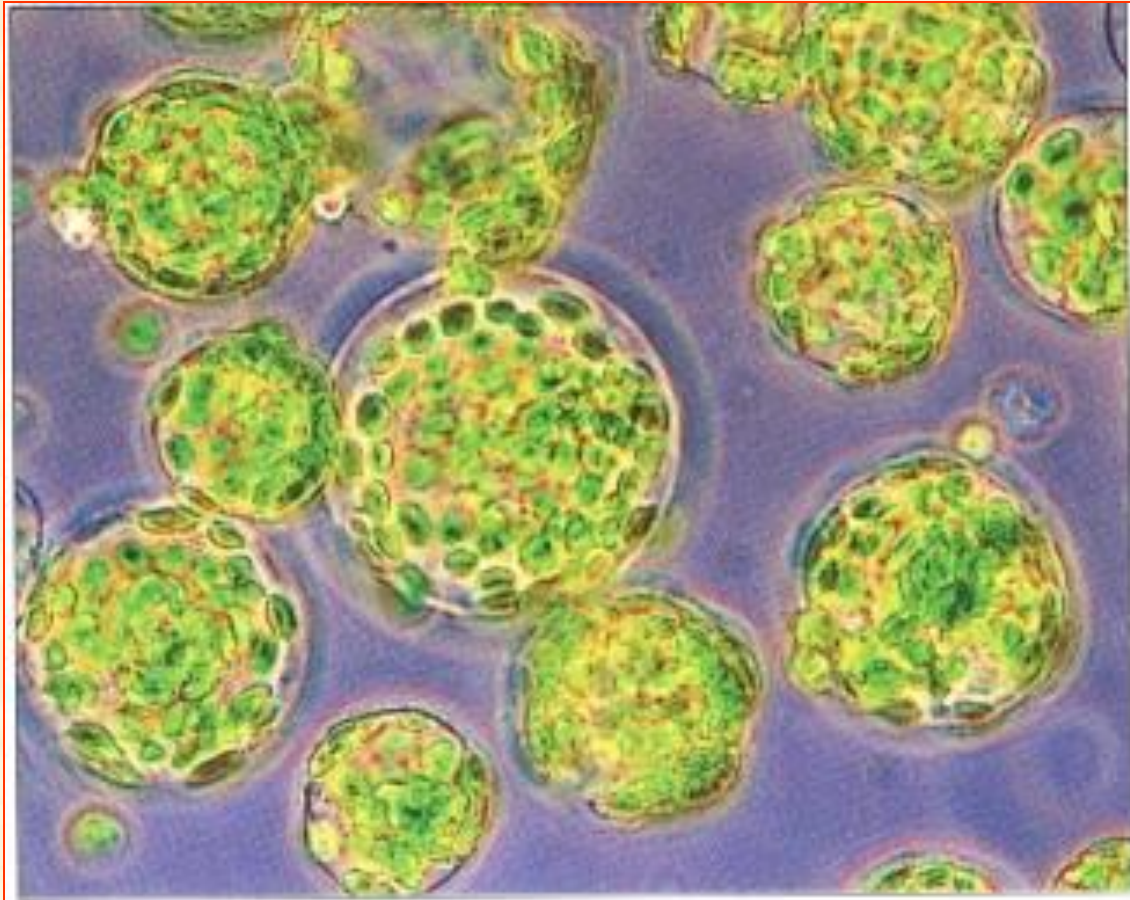


Foto: Arquivo Embrapa Hortaliças



Micro-enxertia:





INGENIERÍA GENÉTICA

Las células vegetales son tratadas químicamente para extraer las gruesas células de la pared externa.

Se introducen genes de otras plantas en las células, y las paredes externas se desarrollan de nuevo.

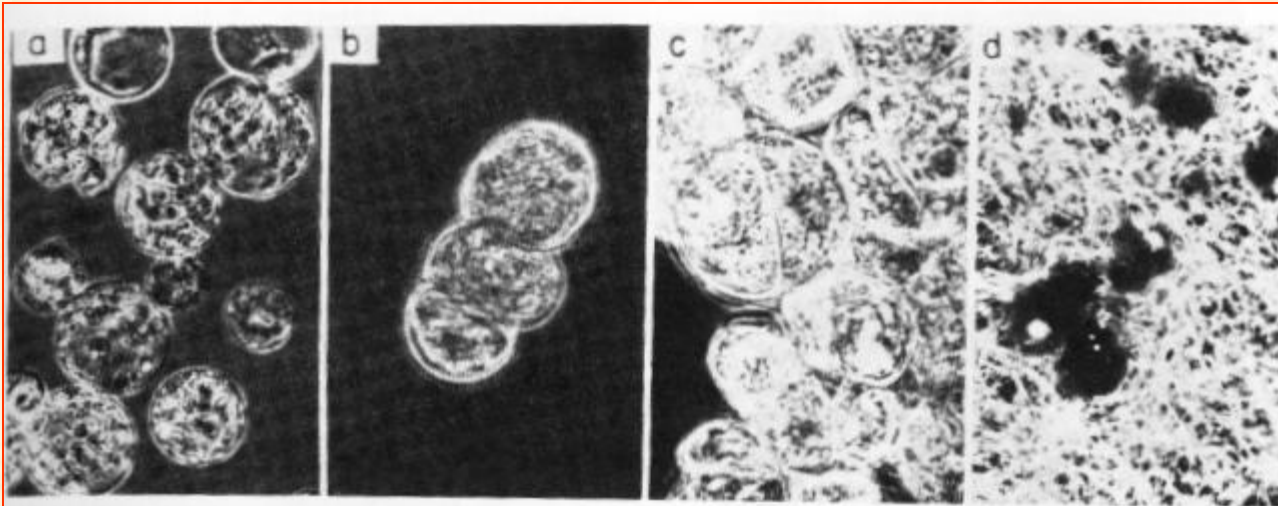


FIGURE 16-13 Protoplasts of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) cotyledons. (a): freshly isolated protoplasts in which cell walls have been removed. (b): four-cell stage after protoplast had resynthesized a cell wall and divided twice. (c): cells from a colony. (d): callus formation. (Courtesy Dr. Tsai-Ying Cheng.)

Quadro 3 – Híbridos somáticos produzidos por fusões de protoplastos

Entre gêneros	Entre espécies
<p><i>Solanum tuberosum</i> + <i>Lycopersicon esculentum</i> <i>Daucus carota</i> _ <i>Aegopodium padagraria</i> <i>D. carota</i> + <i>Petroselenium hortense</i> <i>Citrus sinensis</i> + <i>Poncirus trifoliata</i> <i>Brassica oleracea</i> + <i>Sinapis turgida</i> <i>B. oleracea</i> + <i>Moricandia arvensis</i> <i>Nicotiana tabacum</i> + <i>Hyoscyamus muticus</i> <i>Lycopersicon peruvianum</i> + <i>Petunia hybrida</i> <i>Oryza sativa</i> + <i>Echinochloa oryzicola</i></p>	<p><i>Nicotiana tabacum</i> + <i>N. repanda</i> <i>N. tabacum</i> + <i>N. rustica</i> <i>Solanum tuberosum</i> + <i>S. nigrum</i> <i>Datura innoxia</i> + <i>D. discolor</i> <i>Brassica oleracea</i> + <i>B. campestris</i> <i>B. napus</i> + <i>B. campestris</i> <i>Oryza sativa</i> + <i>O. officinalis</i> <i>O. sativa</i> + <i>O. eichingeri</i> <i>O. sativa</i> + <i>O. brachyantha.</i></p>
<p>FONTE: Dados básicos: Carneiro et al. (1998).</p>	

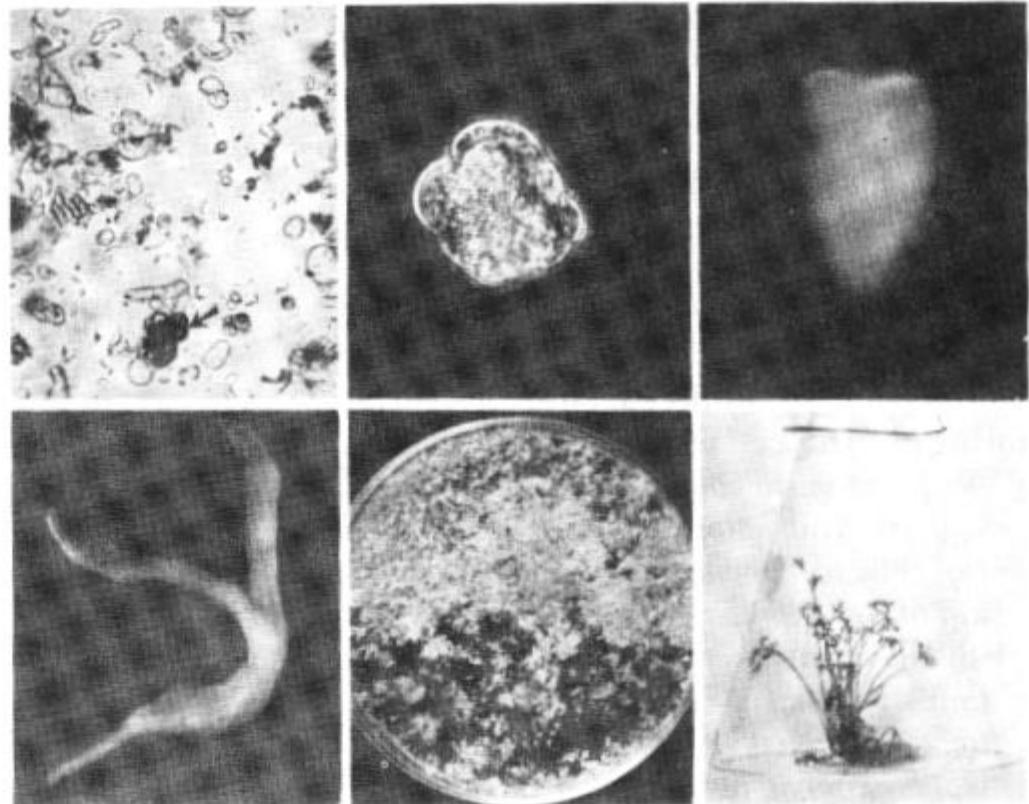
- **Resgate de embriões:**

- busca de variabilidade genética espécies silvestres
- cruzamentos incompatíveis
 - (não) fusão de gametas, abortamento de embriões
 - má formação do endosperma (barreiras pós-zigóticas)
 - resgate do embriões em meio de culturas
 - híbridos intra-específicos, intra-genéricos, inter-famílias
 - meio de cultura substitui o endosperma:
 - nutrientes inorgânicos e carboidratos
 - vitaminas
 - fitormônios
- cultura de ovários fecundados (barreiras pré-zigóticas)

- **Cultura de anteras ou grãos de pólen :**

- homozigose: sete a nove gerações de auto-fecundação
- plantas haplóides
- haplodiploidização:
 - colchicina: inibe a migração das fibras do fuso durante a mitose, impede migração dos cromossomos.

FIGURE 16-15 Embryogenesis in carrot (159). *Top left:* Highly magnified view of suspended cells and cell clumps derived from tissue cultures of carrot growing in a liquid medium. Arrow points to a clump of cells—the beginning stage for an embryoid. *Top center:* Single-cell clump (higher magnification) illustrating the globular stage of development. *Top right:* A more advanced heart-shaped stage of embryoid development. *Below left:* Mature embryoid that developed continuously from the globular stage, through the heart and torpedo (not shown) stages. *Below center:* Thousands of carrot plantlets that developed as embryoids. *Below right:* Single carrot plant that grew from a single embryoid transplanted from previous stage. (Courtesy F. C. Steward and M. O. Mapes.)



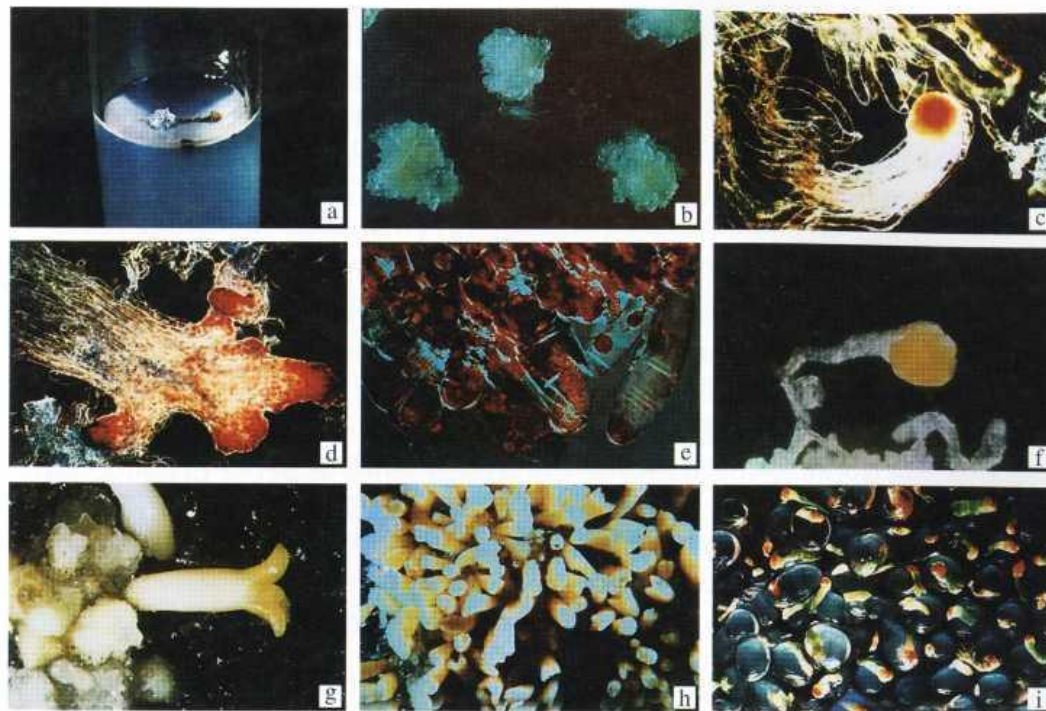
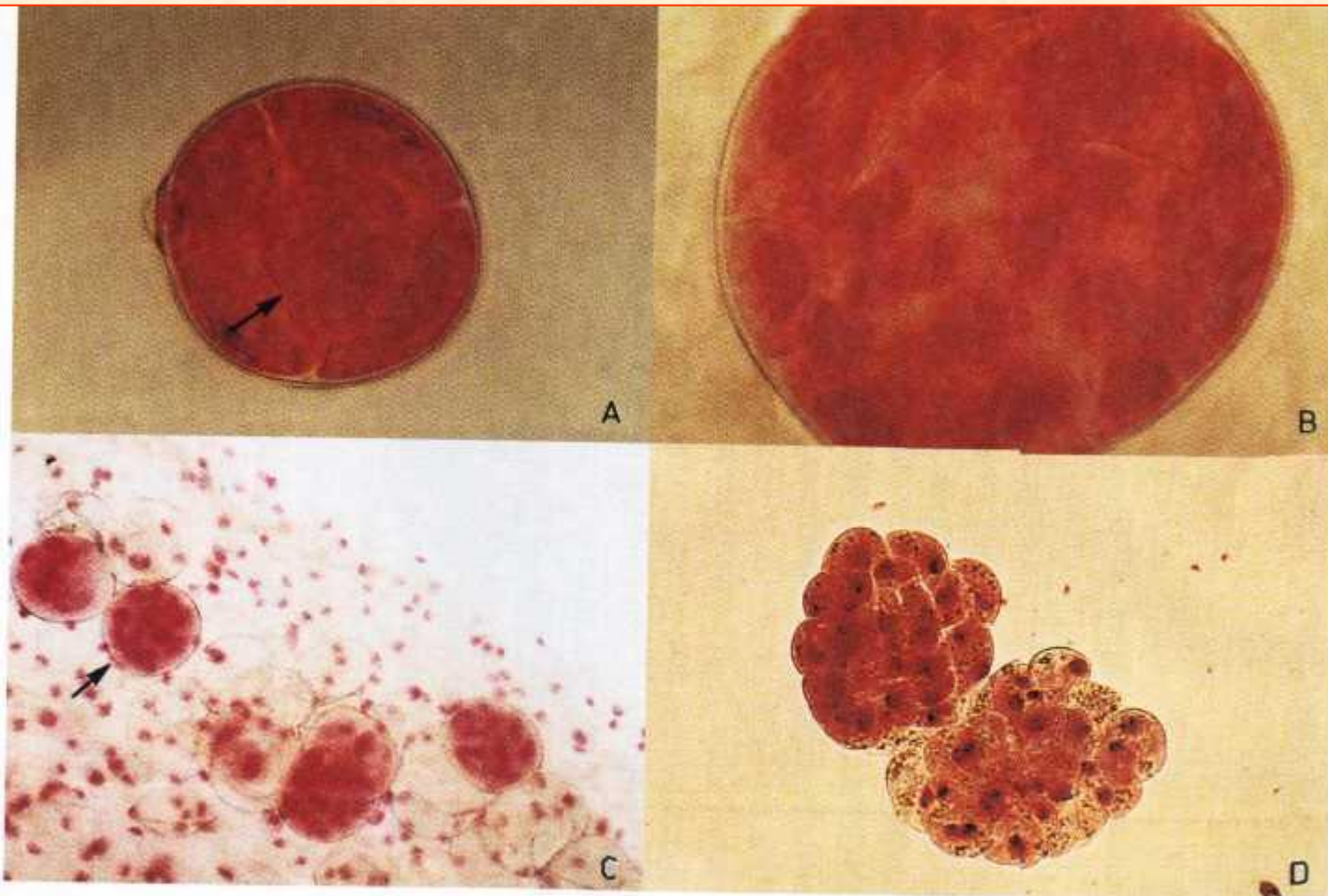


Figura 3. Estádios da poliembriogênese somática em coníferas. **A-B.** *Araucaria angustifolia*. **A.** indução a partir das células do ápice embrionário. Notar as regiões componentes do poliembrião zigótico: roseta (**r**), suspensor (**s**) e ápice embrionário (**a**). **B.** Linhagens celulares suspensor-embrionárias em plaqueamento para a obtenção de ciclos repetitivos de divisão celular. **C-I.** *Picea abies*. **C.** Pró-embrião somático mostrando suspensor e ápice embrionário reativo ao carmim acético (x40). **D.** Complexos celulares suspensor-embrionários mostrando divisão por clivagens (x10). **E.** Células tubo-embrionárias binucleadas. Um dos núcleos migra para uma das extremidades da célula para formar o complexo apical e outro núcleo migra para outra extremidade para formar o complexo suspensor (x100). **F.** Estádio globular tardio (x6). **G-H.** Estádio cotiledonar mostrando a formação de cotilédones múltiplos e alta taxa de regeneração. **I.** Embriões somáticos encapsulados em alginato de sódio para a obtenção de sementes sintéticas. Foto: Miguel P. Guerra.



1. Desenvolvimento *in vitro* de embriões androgênicos. A) Grão de pólen embriogênico de trigo, com seis células individualizadas (seta) e ainda envolto pela exina; B) Pró-embrião multicelular de trigo; C) Fragmento de antera de cevada mostrando alguns grãos de pólen em processo de divisão (seta) e outros em processo de degeneração. D) Pró-embriões de cevada no estágio globular após o rompimento da exina. (Fotos: Embrapa Trigo; Brammer *et al.*, 1995; Stival, 1995).

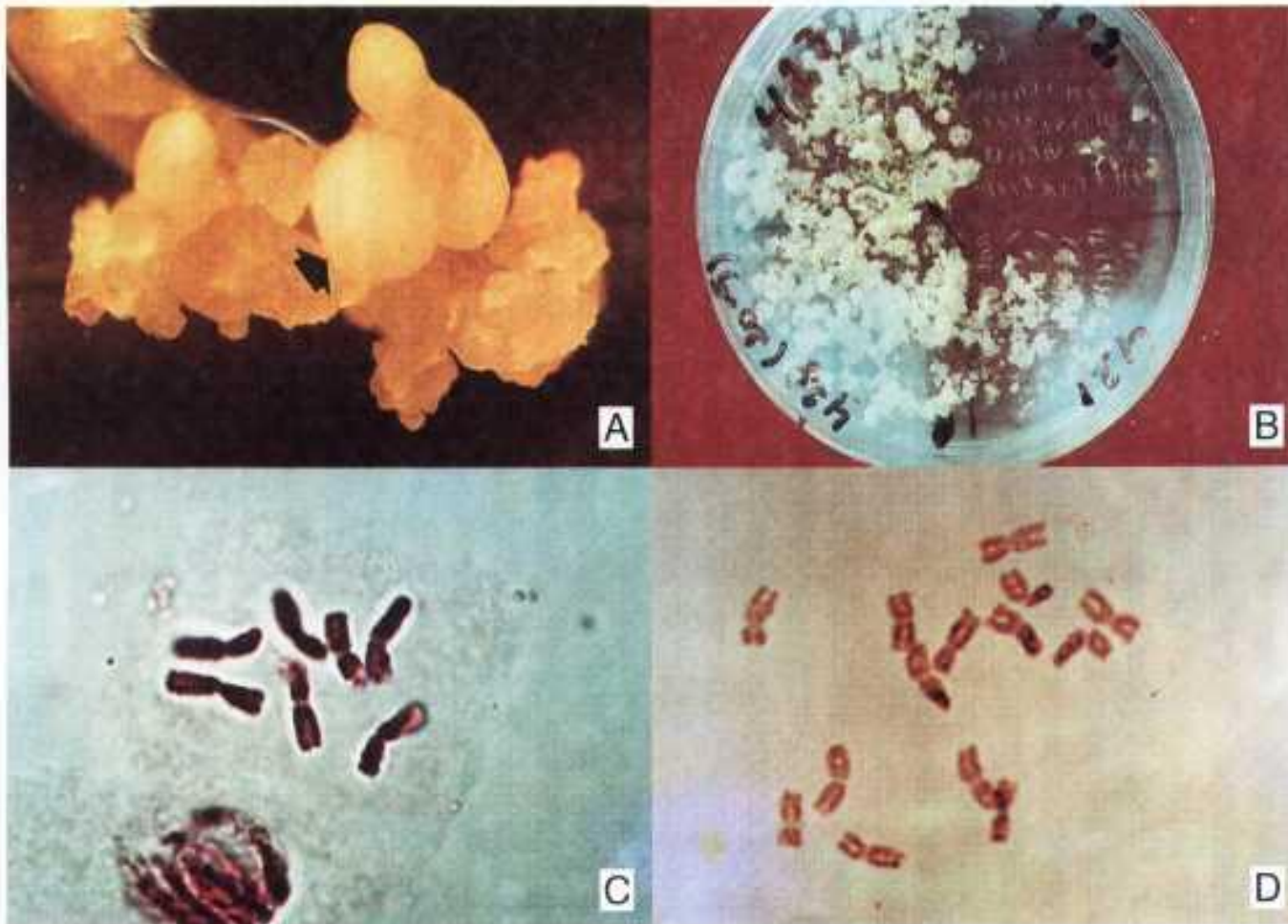


Figura 5. Androgênese *in vitro* no melhoramento da cevada. A) Antera mostrando detalhe de embrióide; B) Variação na resposta androgenética de quatro genótipos (420, 421, 422 e 423) da população F_1 , resultante do cruzamento MN668 X PFC9104. Observar formação de calos e início do desenvolvimento de plantas verdes (seta); C) Cromossomos somáticos de planta haplóide ($2n=7$); e D) duplicada espontaneamente ($2n=14$). (Fotos: Embrapa Trigo/Stival, 1995).

- **Sementes sintéticas:**
 - associada aos avanços na embriogênese somática
 - embrião somático: estrutura bipolar similar ao zigótico, sistema vascular fechado, sem recombinação gênica
 - propagação vegetativa
 - embriões nucleares: somáticos
 - encapsulamento em hidrogel (alginato de sódio + sais minerais, carboidratos, reguladores, pigmentos opacos, etc)
 - embriogênese direta: embriões diretamente de tecidos
 - embriogênese indireta: embriões originam de calos
 - Problemas:
 - baixa resistência dessecação, dano mecânico, baixa difusão de CO₂ e O₂
- **Conservação e intercâmbio de germoplasma:**
 - crescimento lento, livre de contaminantes, quarentena, indexação, multiplicação, distribuição, espaço, etc
 - limpeza de viroses (meristemas e termoterapia)



SEMILLAS PREGERMINADAS

Las semillas pregerminadas (en este caso de alfalfa, una especie forrajera para el consumo del ganado) pueden mantenerse húmedas y nutridas si se envuelven en granos de gel. Las delgadas plántulas se desarrollan libremente antes de ser sembradas.

BOX 7 GETTING MORE IN DEPTH ON THE SUBJECT

SYNTHETIC SEEDS



A synthetic seed (also called *synseed*) contains an embryo produced by somatic embryogenesis enclosed within an artificial medium that supplies nutrients and is encased in an artificial seed covering (210). Technology to carry out each of these steps is available for some crop seeds, although it is not available as a commercial operation (80, 130, 187). Plant patents protect many of these operations.

The proposed uses for synthetic seeds include:

1. Clonal propagation to replace traditional seed propagation.
2. A replacement to hand-pollinated hybrid plants.
3. Carriers for beneficial microorganisms, pesticides, and growth regulators.

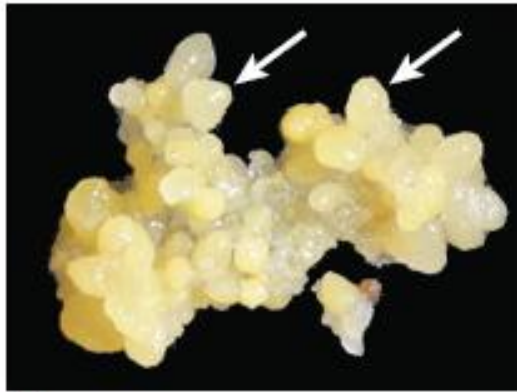
The process of developing synthetic seeds starts with the development of somatic embryos, as previously described. Synchronous development is important to get a large number of somatic embryos at the same stage of development for further treatment. Considerable progress has been made in the development and utilization of large reactor vessels (187) to generate embryos similar to those used in fermenters or mass propagation of microbes and cells for industrial production of pharmaceuticals and other products. Somatic embryos are then either directly encapsulated or partially dehydrated before encapsulation. Materials that have been used for encapsulation include sodium alginate (a soluble hydrogel), carrageenan gum, Gelrite, and polyoxyethylene (polyox wafers) (80, 130, 211). Synthetic seeds can then be sown for germination like

traditional seeds. Fluid drilling (80) has some potential as a planting procedure for seeds that are not encapsulated. One major difference between synthetic and most natural crop seeds is the short storage life of synthetic seeds.

Vegetative plant parts, often regenerated in tissue culture, can also be encapsulated in a fashion similar to somatic embryos (Fig. 32), including shoot tips, axillary buds, and nodal segments. Encapsulated vegetative parts can be used as propagation units similar to synthetic seeds, but they have received the greatest attention as a mode of cold storage germplasm preservation and germplasm exchange (199).



Figure 32
Vegetative parts of African violet encapsulated in alginate beads.



(a)



(b)

Figure 36

Somatic embryo induction. (a) Polyembryogenic masses are aggregates of organized cells that will continue to be produced on a 2,4-D medium in an agitated liquid culture. (b) These will form somatic embryos when moved to a stationary development medium where the 2,4-D has been removed.

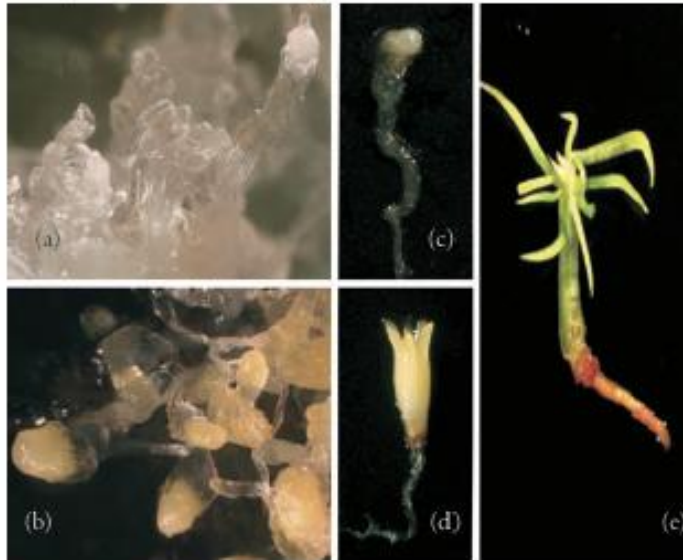


Figure 37

Photos showing developmental stages during somatic embryogenesis in interior spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss *x engelmanni* Parry ex Engelm]. (a) Embryogenic tissue, (b) An immature somatic embryo at its early developmental stage. (c) Immature somatic embryos at pre-cotyledonary stage. (d) A mature somatic embryo with well-developed cotyledons. (e) A somatic embryo-derived seedling. Photos provided by Patrick von Adarkas and Lishang Kong, University of Victoria, Victoria, BC Canada.

- **Plantas geneticamente modificadas:**

- alguns métodos dispensam cultivo *in vitro*
- maioria das plantas geneticamente manipuladas utilizaram o processo *in vitro*

- *Agrobacterium tumefaciens*:

- co-cultivo do material (discos foliares ou embriões na presença da bactéria)
 - » após transferência do plasmídeo o tecido transformado deve regenerar uma planta *in vitro*

- *Agrobacterium rhizogenes*:

- raízes em cabeleira
 - » produção de metabólitos secundários

- recuperação dos transformantes:

- meio de cultura seletivo, antibióticos, herbicidas, etc

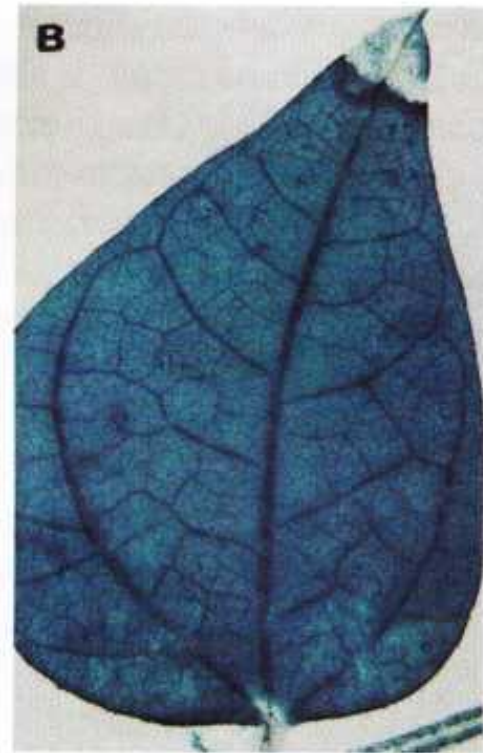
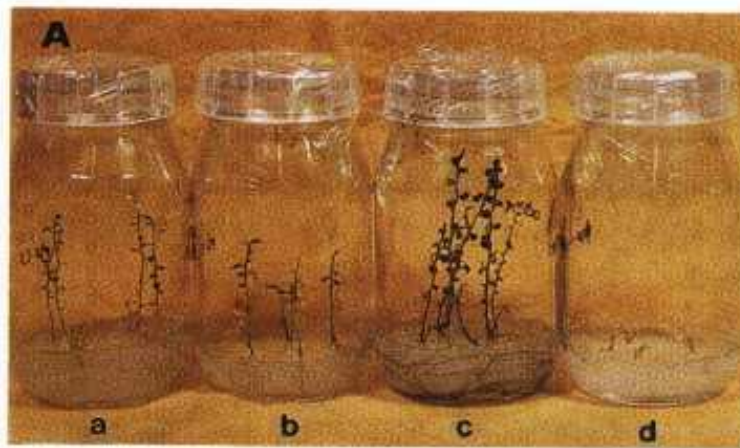


Figura 1. (A) Plantas *in vitro* de batata (*Solanum tuberosum* cv. Mantiqueira), a: planta transgênica em meio não seletivo, b: planta transgênica em meio seletivo contendo o herbicida fosfinotricina (10 mg.l^{-1}), c: planta-controle em meio não seletivo, d: planta-controle em meio seletivo contendo o herbicida fosfinotricina (10 mg.l^{-1}); (B) Expressão do gene *gus* em folhas de feijoeiro transgênico (*Phaseolus vulgaris* cv. Olathe Pinto); (C) Sintoma da galha-dacoroa em plantas de mandioca (*Manihot esculenta* cv. MCol 22) em casa de vegetação. Foto: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

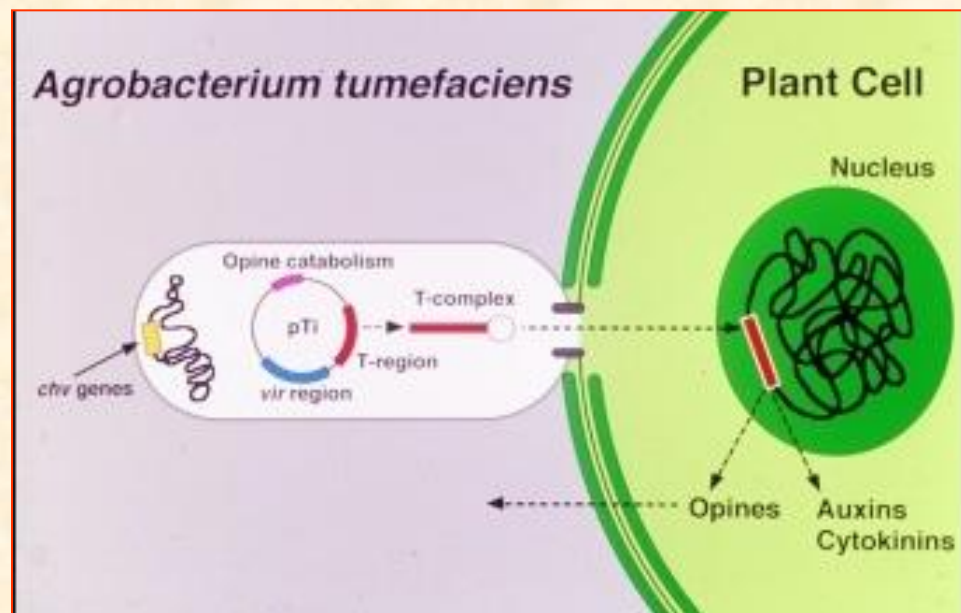
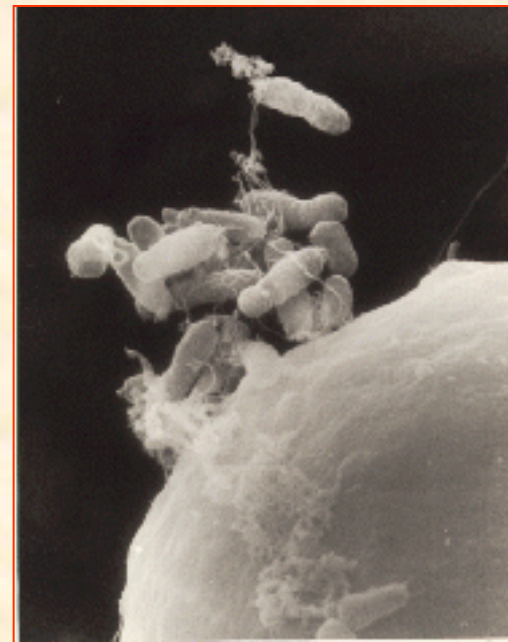
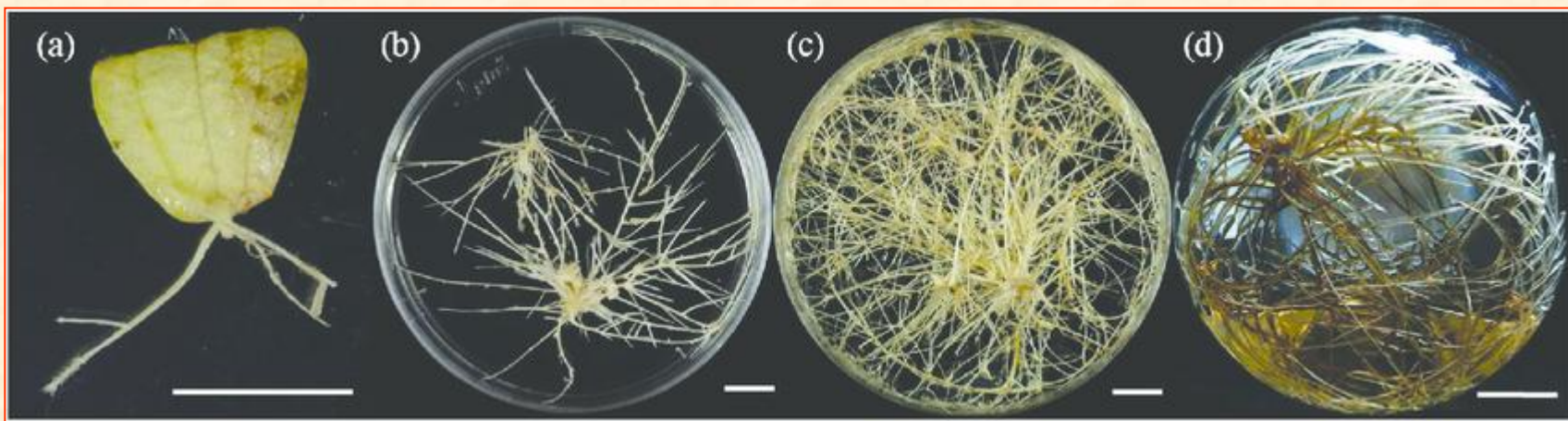


Figura 1. Infecção por *Agrobacterium*. (A) Sintomatologia da doença 'crown gall' em planta de tomate, 30 dias após infecção com *Agrobacterium tumefaciens* cepa C58. (B) Planta de *Kalanchoe* apresentando sintomas de 'hairy root', 30 dias após infecção com *Agrobacterium rhizogenes* estirpe 15834. Foto: Marie-Anne Van Sluys



Cultura de raízes em cabeleira (hairy roots) mediadas por *Agrobacterium rhizogenes* em *Gentiana scabra*. (a) Indução de raízes em cabeleira a partir das extremidades cortadas das folhas (b) cultivadas em meio sólido WPM por 4 semanas (c) cultivadas em meio sólido WPM por 8 semanas e (d) cultivadas em meio líquido B5 por 4 semanas. Barra de escala = 1,0 cm.