

PRÁTICA Nº. 7.14

MICROPROPAGAÇÃO VEGETAL

INTRODUÇÃO

A micropropagação, também denominada multiplicação *in vitro*, consiste no cultivo de porções de tecidos (explantes) extraídos de uma planta e cultivados *in vitro* sob condições assépticas. Órgãos inteiros ou porções (embriões, brotos, folhas, raízes e flores), assim como, tecidos, calos e/ou até mesmo células vegetais sem a parede celular (protoplastos) podem ser utilizados para o início dos cultivos. A micropropagação é uma das áreas mais importantes da biotecnologia, contribuindo em diferentes linhas de pesquisa e nos mais diversos campos da biologia vegetal.

Os estudos relacionados à micropropagação tiveram seu início com a formulação da teoria celular por Schleiden e Schwann, em 1838. Segundo a teoria, todos os seres vivos são constituídos por células, uma espécie de fábrica química onde se realizam todos os processos necessários à vida do organismo, sendo cada célula derivada de outra célula. Fundamentado nos postulados da teoria celular, Haberlandt, propôs, em 1902, a teoria da totipotência celular, atribuindo a toda célula viva e nucleada o potencial genético para desenvolver uma planta inteira, base teórica da clonagem.

A principal vantagem da micropropagação é o potencial que ela apresenta de aumentar a velocidade e o rendimento da propagação clonal, bem como o de produzir plantas saudáveis sob o aspecto fitossanitário. Esse método, geralmente, é indicado para a propagação de espécies que se multiplicam muito lentamente e/ou que não podem ser clonadas por meio de técnicas tradicionais. A cultura de brotos axilares consiste em uma miniaturização da produção de plantas por estaquia, a partir de meristemas laterais ou terminais. Plântulas obtidas por meio da micropropagação tendem a reproduzir fielmente o genótipo das plantas que forneceram os explantes em um processo típico de clonagem. A diferenciação de brotos adventícios ocorre diretamente a partir dos explantes, ou, indiretamente, a partir de calos.

Em 1974, Toshio Murashige desenvolveu o conceito de estádios de desenvolvimento na micropropagação, detalhando os procedimentos necessários, desde o estabelecimento *in vitro* dos explantes, até o restabelecimento das plantas em condições de campo. No estágio 1, de introdução das culturas *in vitro*, a identificação genotípica do material vegetal e a sua desinfestação, possibilitando o estabelecimento asséptico, são os primeiros passos para o sucesso dos cultivos *in vitro*. A manutenção das culturas em condição estabilizada e a multiplicação das brotações em quantidades suficientes para o enraizamento são os objetivos básicos do estágio 2. A principal finalidade do estágio 3 é o enraizamento das brotações produzidas no estágio anterior e, em alguns casos, preparar as plântulas para o transplante em casa de vegetação ou no campo. O estágio 4, de aclimatização *ex vitro*, se destina à transferência gradual das plântulas das condições de cultivo *in vitro* para condições ao ar livre. Em outras palavras, a aclimatização consiste na transferência das plântulas de uma condição heterotrófica, com dependência direta da sacarose adicionada ao meio de cultura sob condições assépticas, para a condição autotrófica ou de vida livre, na qual a fotossíntese supre as necessidades de carboidratos das plantas.

OBJETIVOS

Ilustrar as principais etapas da micropropagação e os procedimentos envolvidos na utilização dessa técnica biotecnológica.

MATERIAIS

- Laboratório de cultura de tecidos (sala de crescimento)



- Geladeira



- Câmara de fluxo laminar



- pHmetro



- Autoclave



- Deionizador de água



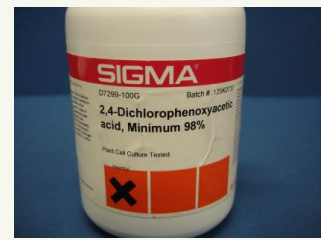
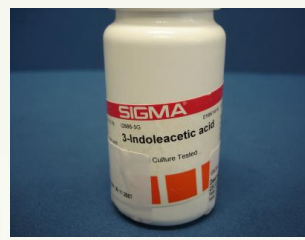
- Balança analítica



- Ágar-ágar, sais minerais, carboidratos, vitaminas, etc.



- Reguladores de crescimento



PROCEDIMENTOS

Quando os cultivos têm início com materiais provenientes do campo, os primeiros procedimentos da micropropagação visam o estabelecimento *in vitro* de culturas assépticas, a partir de diferentes porções (explantes) de uma planta. Essa fase se constitui no estágio 1 dos procedimentos de micropropagação. Visando reduzir os riscos de contaminação por fungos e bactérias, os órgãos ou estruturas utilizados como explantes devem ser previamente desinfestados. Para esse fim, são utilizados diferentes agentes antibióticos, com destaque para a água sanitária comercial (hipoclorito de sódio). Em certos casos, agentes adsorventes, como o carvão ativo e a polivinilpirrolidona (PVPP), podem ser necessários para o controle da oxidação fenólica. Após a desinfestação, os explantes são preparados e inoculados *in vitro*, em câmaras de fluxo laminar, no interior de frascos contendo meios de cultura previamente autoclavados, adicionados ou não de reguladores de crescimento, nutrientes minerais, vitaminas e ágar. Posteriormente, os frascos com os explantes são tampados e transferidos para salas de crescimento sob condições de temperatura e fotoperíodo controlados.

Uma vez estabelecidos *in vitro*, as culturas são submetidas à multiplicação em larga escala, etapa que se constitui no estágio 2 da micropropagação. Os meios de cultura utilizados nesse estágio dos procedimentos de cultivo *in vitro* incluem, geralmente, os reguladores de crescimento benzil-aminopurina (BAP) ou ácido giberélico (GA₃), combinados ou não com o ácido naftalenoacético (ANA).

Após a fase de multiplicação, as culturas são submetidas aos procedimentos de enraizamento *in vitro*, etapa correspondente ao estágio 3 da micropropagação. Normalmente, nessa etapa, as microestacas são transferidas para meios de cultivo sem a adição de citocininas ou de giberelinas, sendo os meios suplementados apenas com auxinas como o ácido naftalenoacético (ANA), o ácido indol acético (AIA) ou o ácido indol-butírico (AIB).

No estágio 4 da micropropagação, as plântulas enraizadas são aclimatizadas e restabelecidas em condições de campo. Nessa etapa, as plântulas são mantidas inicialmente em bandejas de isopor recobertas com plástico transparente, visando simular o ambiente úmido encontrado no interior dos tubos de ensaio. A cobertura plástica é retirada gradativamente e o turno de rega é lentamente reduzido, até que as plântulas estejam completamente aclimatizadas. Após esse período de adaptação, as plântulas são transferidas para casa de vegetação, onde são mantidas em sistema de nebulização por microaspersão. Posteriormente, as plantas completamente aclimatizadas são restabelecidas em condições de campo.