

CLONAGEM VEGETAL

CLÁUDIA ULISSES¹
LÍLIA WILLADINO^{1,2}
CYNTHIA CAVALCANTI DE ALBUQUERQUE³
TEREZINHA RANGEL CÂMARA¹

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco.

² Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Salinidade, Fortaleza, Ceará.

³ Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Mossoró, Rio Grande do Norte.

I. INTRODUÇÃO

A clonagem vegetal, ou micropropagação, é uma técnica do cultivo *in vitro* de plantas que abrange de forma interdisciplinar as áreas de morfologia, fisiologia, bioquímica, fitopatologia, genética, entre outras. A micropropagação vem se destacando em vários setores agrícolas, tais como: fruticultura, floricultura, horticultura, como também na área florestal, por promover o incremento da produção de mudas vigorosas e livres de patógenos, contribuindo conseqüentemente, para o aumento da produtividade do setor agrícola.

A terminologia “cultivo *in vitro* de plantas” engloba o cultivo de células, tecidos e órgãos de plantas. Existem várias técnicas de cultivo *in vitro* de plantas além da micropropagação dentre elas podemos citar: o cultivo de protoplastos, que permite hibridizar variedades diferentes vencendo barreiras genéticas; o cultivo de anteras que viabiliza a produção de plantas haplóides, que em seguida diploidizadas produzem um só tipo de gameta para um determinado locus (produção de linhagens puras); limpeza clonal utilizada para produção de plantas livres de patógenos, entre outras. O cultivo *in vitro* de células, tecidos e/ou órgãos, dá também suporte técnico a trabalhos de transformação genética e obtenção de plantas transgênicas.

Dentre as técnicas de cultivo *in vitro*, a micropropagação é uma das aplicações mais rotineiras e de maior impacto para agricultura, pois permite uma rápida multiplicação das plantas em larga escala, com características agronômicas superiores. Os explantes,

E-mails: claudia@nlink.com.br; lilia@pq.cnpq.br; cycavalcanti@gmail.com; tkrcamara@bol.com.br.

segmento de tecido ou órgão retirado da planta matriz utilizado para iniciar o cultivo *in vitro*, utilizados mais frequentemente são ápices caulinares, meristemas ou gemas.

2. MICROPROPAGAÇÃO

A micropropagação também conhecida por propagação *in vitro* ou clonagem de plantas, permite a propagação em larga escala de plantas saudáveis, conservando as mesmas características agrônômicas da planta mãe. Muitas vezes a propagação assexuada convencional é um processo lento e apresenta sérios riscos de disseminação de doenças e pragas, que podem comprometer a produção. A micropropagação permite produzir milhares de plantas, livres de doenças em curto espaço de tempo.

A técnica de micropropagação consiste, basicamente, em cultivar em ambiente asséptico (laboratório) segmentos de plantas (gemas, ápices caulinares, meristemas, fragmentos de folhas e raízes, entre outros), em frascos específicos contendo meio nutritivo adequado, proporcionando a produção de milhares de plantas idênticas a planta mãe (Figura 1A e 1B).

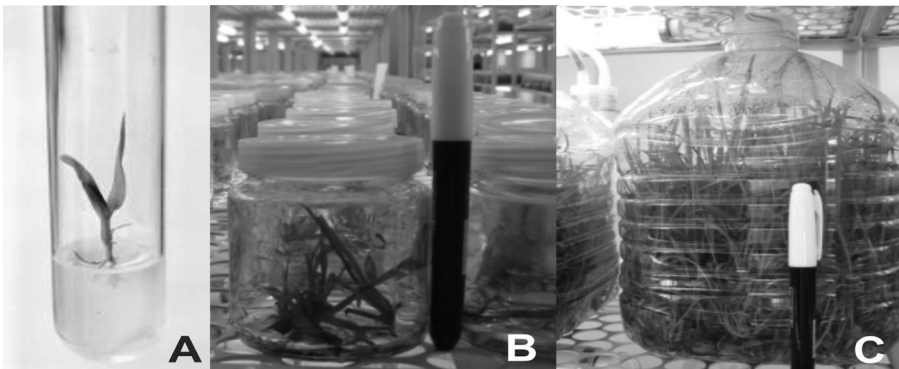


Figura 1. — Produção de mudas *in vitro*: mudas cultivadas pelo método convencional (A e B) e sistema de biorreator de imersão temporária contendo plantas (C).

O sistema de micropropagação pode ser dividido em diferentes estágios:

Estágio I – Seleção da planta mãe ou matriz: Geralmente as plantas matrizes possuem características agrônômicas superiores e recebem tratamento fitossanitário, nutricional e hídrico, para aumentar a probabilidade de sucesso nos estágios seguintes da micropropagação;

Estágio II – Seleção e tratamento do explante: Nesse estágio retira-se um segmento de tecido (explante) da planta matriz, desinfesta-se e inocula-se em meio

nutritivo sob condições assépticas;

Estágio III – Fase de multiplicação: Para propagação *in vitro* utiliza-se principalmente gemas apicais e axilares, além de brotações laterais para realizar os sucessivos subcultivos;

Estágio IV – Fase de enraizamento: Transferência das partes aéreas para meio de enraizamento e posteriormente transplantio e aclimatização das plantas em substrato.

A etapa de transplantio envolve a transferência das plantas da condição *in vitro* para telado de aclimatização (condição *ex vitro*). Essas plantas são transferidas para tubetes, bandejas ou potes plásticos contendo substrato, que pode ser solo, areia entre outros. Após o período de aclimatização, as plantas serão levadas ao campo, onde desenvolvem-se normalmente.

A passagem do cultivo *in vitro* para *ex vitro* é crítica e representa, em alguns casos, um fator limitante do processo de micropropagação. Isto se deve basicamente aos seguintes fatores:

a) a planta passa de uma situação de reduzido fluxo transpiratório, devido à baixa intensidade de luz e à elevada umidade relativa, para um ambiente que demanda um incremento na taxa de transpiração, ficando muito susceptível ao estresse hídrico;

b) a planta passa de uma existência heterotrófica, na qual depende de um suprimento externo de energia (sacarose no meio), para um estado autotrófico, no qual precisa realizar fotossíntese para sobreviver;

c) a planta passa de uma condição de alta disponibilidade de nutrientes no meio, para uma condição onde precisa rapidamente incrementar a absorção de sais.

3. APLICAÇÃO COMERCIAL DO CULTIVO *IN VITRO* DE PLANTAS

O sucesso de todo e qualquer empreendimento agrícola está condicionado, dentre outros fatores, à qualidade do material propagativo utilizado, que deve ser produzido segundo os mais modernos preceitos tecnológicos, resultando em um elevado potencial produtivo de espécies de plantas cultivadas em escala empresarial.

A utilização da micropropagação em âmbito comercial já é realizada em diversos países do mundo com destaque para Europa Ocidental, América do Norte, Ásia, Austrália e Israel. No Brasil, a principal limitação para o acesso dos produtores às mudas micropropagadas é relativamente o elevado custo deste tipo de material propagativo sendo, entretanto, bastante superior ao das mudas convencionais.

A preocupação com os elevados custos de produção das mudas micropropagadas

tem mobilizado a atenção de pesquisadores durante as últimas quatro décadas. As atividades desenvolvidas em um laboratório de cultivo *in vitro* de plantas são realizadas em ambiente asséptico com temperatura e luminosidade controladas, e as plantas desenvolvem-se em meio de cultivo artificial, meio nutritivo, que fornece as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controla, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*. As mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas que funcionam nas plantas em condição de campo são conservadas nas células cultivadas *in vitro*, embora alguns processos, como a fotossíntese, possam ser inativadas pelas condições de cultivo e pelo estado de diferenciação das células. Por isso os meios nutritivos se baseiam nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais e, complementando as substâncias sintetizadas pelas células, vários compostos orgânicos são adicionados ao meio para suprirem as necessidades metabólicas, energéticas e estruturais das células. De uma maneira geral, considera-se que o meio nutritivo é constituído por água, macro e micronutrientes, carboidratos, vitaminas e reguladores de crescimento, além de outros aditivos específicos para uma cultura determinada ou fase específica de cultivo. Os meios nutritivos podem ser líquidos ou sólidos, sendo que a cultura em meio líquido exige algum tipo de suporte ou agitação para fornecer o oxigênio necessário para a respiração do material vegetal. O meio líquido além de disponibilizar de forma homogênea os nutrientes para a planta reduz de forma significativamente o custo de produção das mudas, uma vez que não utiliza agar ou gomas de gellan para a solidificação do meio.

Desde a década de 80 trabalhos de pesquisa vêm sendo desenvolvidos visando a substituição dos meios gelificados por meios líquidos, os quais resultaram na incorporação de inovações tecnológicas que incrementaram a produtividade e a automatização das rotinas de micropropagação. Na década de 90 foi estabelecido um novo conceito de cultivo *in vitro*, o cultivo em biorreatores, definitivamente estabelecido por Teisson & Alvard (1994). O funcionamento do sistema de imersão temporária consiste na transferência periódica do meio de cultura de um recipiente onde fica armazenado, para outro recipiente onde ficam as plantas (Figura 1C). O meio líquido cobre totalmente os explantes, em intervalos regulares de tempo. O maior contato das plantas com o meio de cultura incrementa sua absorção uma vez que os nutrientes podem ser absorvidos diretamente pela epiderme das folhas, caules e raízes. A drenagem do meio líquido implica na renovação periódica do ar dos biorreatores a cada período de imersão, evitando o acúmulo de gases nocivos e contribuindo para melhorar as taxas de multiplicação e aumento de biomassa dos

explantes. As taxas de multiplicação em biorreatores incrementam em, no mínimo, 200% a produção de mudas de cana-de-açúcar, banana, abacaxi, entre outros, quando comparado com o sistema convencional que utiliza o meio sólido.

Uma vez obtido o número de mudas desejado, as plantas são aclimatizadas em casa de vegetação (Figura 2) e em seguida levadas para o campo.

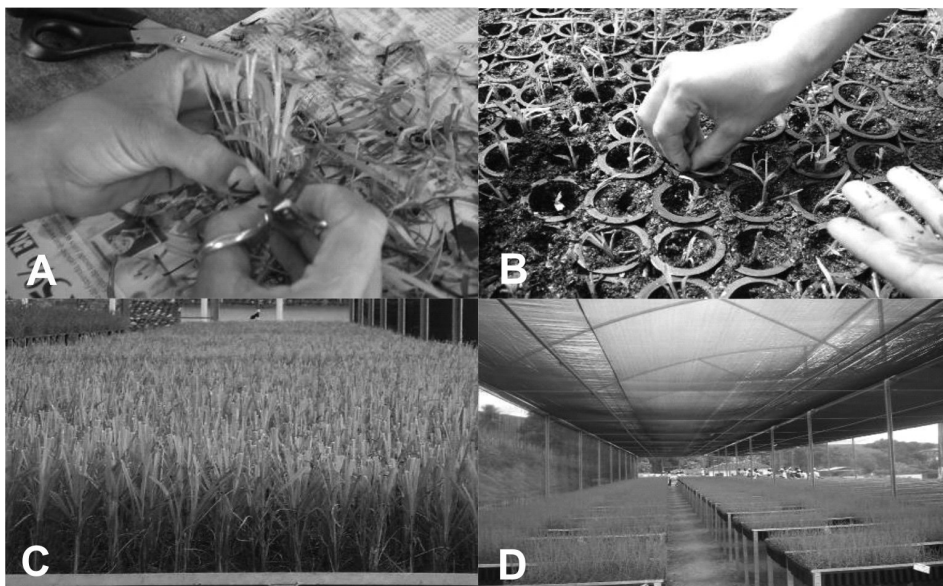


Figura 2. — Aclimatização de mudas de cana-de-açúcar: separação das mudas (A) e plantio em tubetes em casa-de-vegetação (B, C e D).

Comercialmente, os trabalhos têm sido focados principalmente nas espécies ornamentais, frutíferas e florestais, criando muitos postos de trabalhos em laboratórios comerciais, viveiros e fazendas, dentre outros setores envolvidos na logística do comércio internacional de mudas micropropagadas.

Atualmente são chamados de biofábricas os laboratórios de micropropagação de plantas, que produzem em larga escala mudas certificadas provenientes do cultivo *in vitro*.

No Estado de Pernambuco, em Recife, a Biofábrica Governador Miguel Arraes, pertencente ao CETENE (Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste), são desenvolvidos protocolos para a micropropagação em larga escala de variedades e clones de cana-de-açúcar, espécies frutíferas, ornamentais, oleaginosas e florestais de importância estratégica para o Nordeste.

O grande diferencial da Biofábrica do CETENE está na utilização de Biorreatores

de Imersão Temporária. Com essa tecnologia, a Biofábrica tem capacidade instalada para produzir 1,5 milhões de mudas de cana-de-açúcar por mês, sendo considerada a maior da América Latina em termos de produção.

4. AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Biofábrica Governador Miguel Arraes–CETENE por disponibilizar as imagens de suas instalações.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBARRAN, J., BERTRAND, B., LARTAU, D.M. & ETIENN, E.H. Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica*) somatic embryos. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 81:27–36. 2005.

ANGELA, M., MORDOC, C.O., JEAN, A., BRUMBLE, Y., PRAKAS, H. & LAKSHMAN, A.N. Development of a temporary immersion system (RITA® for mass production of sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids). *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 45:450–457. 2009.

CID, L.P.B. A propagação *in vitro* de plantas. O que é isso? *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 19:16–21. 2001.

LE MOS, E.E.P. Micropropagação de plantas por biorreatores. In: Junghans, T.G. & Souza, A.S. Aspectos práticos da micropropagação de plantas. Cruz das Almas. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. 2009. pp.81–119.

PAEK, K.Y., HAHN, E.J. & SON, S.H. Application of bioreactors for large-scale micropropagation systems of plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 37: 149–157. 2001.

SCHERWINSKI–PEREIRA, J.E. Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. Brasília. EMBRAPA Informação Tecnológica. 2010.

SILVA, C.U.C., ALBUQUERQUE, C.C. & BRITO, J.Z. Cultivo *in vitro* de vegetais: considerações básicas. Recife. UFRPE/Imprensa Universitária. 2005.

TORRES, A.C., CALDAS, L.S. & BUSO, J.A. Cultura de tecidos e transformação de plantas. Brasília. EMBRAPA–SPI/EMBRAPA–CNPQ. 1998. v.1.