

## **INTRODUÇÃO À CULTURA *IN VITRO* – ASPECTOS PRÁTICOS**

### **Reguladores de Crescimento**

#### AUXINAS

Naturais – IAA; IBA

Síntese – NAA; 2,4-D; Dicamba

Inibidores oxidação – Fluoroglucinol; ácido ferrúlico

#### CITOCININAS

Naturais – Z; iP; DHZ e Ribósidos;

Síntese – BAP seus Ribósidos e Adeninas; TDZ; Kin

#### GIBERELINAS

Ga<sub>3</sub>; Inibidores (paclobutrazol)

#### ÁCIDO ABSÍSIKO

Inibidores (paclobutrazol)

#### ETILENO

Inibidores (nitrato de prata) e práticas inibitórias

#### POLIAMINAS

Putrescina; sperimidina

#### JASMONATOS

Ácido jasmónico

#### BRASSINOSTEROIDES

## Concentrações, solventes e esterilização

Hormona	solvente	esterilização	Pulse (ppm)*	Meio cultura (mg/l)*
IBA	NaOH/ Etanol	autoclave	2500-5000	0,01-2,5
NAA	NaOH	autoclave		0,01-1,0
IAA	NaOH/ Etanol	autoclave		0,01-2,0
2,4-D	NaOH/ Etanol	autoclave		0,01-5,0
Kn	NaOH	autoclave		0.01-5,0
TDZ	DMSO	filtração		0,001-0,05
Z	NaOH	filtração		0,01-5,0
Ga3	Etanol	filtração		0,01-0,5

\*A concentração hormonal é função da espécie, da variedade e do clone assim como da técnica de aplicação. Os valores referidos para o IBA respeitam ao enraizamento da oliveira e as restantes constam da bibliografia.

### Meio de cultura

Murashige and Skoog (MS) macro elementos, micro elementos, ferro e vitaminas.

### Soluções stock de trabalho:

- Macro 10x concentrado
- Micro 100x concentrado
- Ferro II 100x concentrado
- Vitaminas preparadas em soluções stock, isoladamente e congeladas

## **PROTOCOLO DA AULA**

1 – Visita geral ao laboratório de cultura *in vitro* de tecidos vegetais. Noções básicas da micropropagação, instalações, equipamentos associados e suas diferentes etapas.

2 – Micropropagação da *St. Paulia* spp. Aspectos económicos e de mercado. Particularidades da micropropagação nesta espécie.

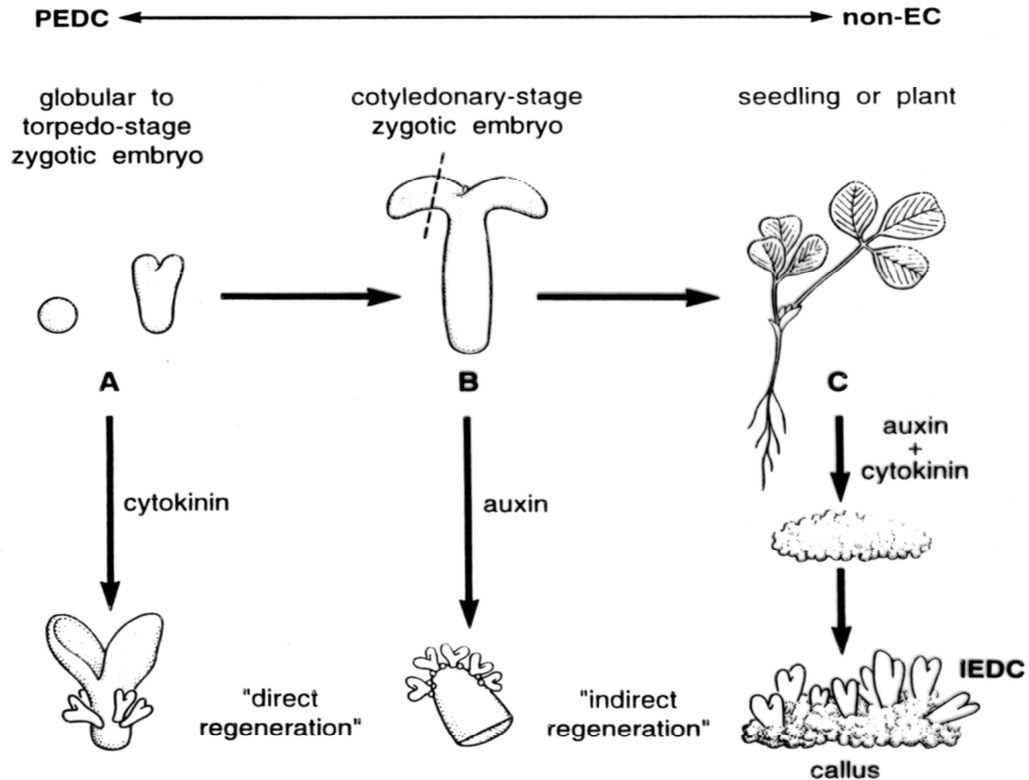
3 - Papel dos reguladores de crescimento no desenvolvimento das plantas *in vitro*.

4 - Manipulação em CFL.

5 – Manipulação básica de plantas *in vitro* e especificações das diferentes fases.

6 – Aspectos técnicos da aclimação de plantas.

Fisiologia da multiplicação *in vitro* da *St. Paulia*



**Fig. 1.** The role of explant status on the initiation of somatic embryogenesis. An explant consists of cells which may fall anywhere in a continuum between a Pre-embryogenically Determined Cell and cells which have lost their embryogenic status altogether, referred to as non-Embryogenic Cells. (A) Very young zygotic embryos may come the closest to PEDC status, and will respond to a cytokinin treatment by forming somatic embryos. (B) More mature zygotic embryos reach a stage when they no longer respond to cytokinins alone, requiring an auxin for somatic embryo formation. Meristematic cells from grasses and other monocots behave similarly. (C) In those plants and tissues in which the non-EC status is reversible, exposure to an auxin and cytokinin leads to the formation of callus able to produce somatic embryos. Such tissue consists of Induced Embryogenically Determined Cells, a term used to indicate the reestablishment of embryogenic potential during culture.

	<b>MS</b>	<b>WPM</b>
	(Murashige & Skoog, 1962)	(Lloyd & McCown, 1981)
<u>Macro (g/l)</u>		
KNO <sub>3</sub>	1.9	0
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.65	0.4
MgSO <sub>4</sub>	0.37	0.37
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.17	0.17
CaCl <sub>2</sub>	0.44	0.09
CaNO <sub>3</sub>	0	0.55
<u>Micro (mg/l)</u>		
MnSO <sub>4</sub>	22.3	29.43
ZnSO <sub>4</sub>	8.6	8.6
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	6.2
KI	0.83	0
CuSO <sub>4</sub>	0.025	0.25
NaMoO	0.25	0.25
CoCl <sub>2</sub>	0.025	0
FeSO <sub>4</sub>	27.85	27.8
Na <sub>2</sub> EDTA	37.25	37.3
<u>Vitaminas (mg/l)</u>		
Mio-inositol	100	
Ác. Nicotínico	1	
Tiamina	10	
Piridoxina	1	
<u>Fonte de carbono (g/l)</u>		
Sacarose	30	
<u>Gelificante (g/l)</u>		
Agar	7	
pH	5.8	

Reguladores de crescimento (mg/l) para a cultura de *Saintpaulia*

NAA	0.5
BAP	1.0

## **Cuidados de assépcia e segurança**

Todas as operações efectuadas em condições de assépcia, na **Câmara de Fluxo Laminar (C.F.L.)**, deverão respeitar as seguintes regras:

- Utilizar protecção de calçado
- Vestir bata
- Retirar anéis e pulseiras
- Atar cabelos
- Trabalhar de forma a não se sobrepor ao material esterilizado
- Desinfectar mãos e antebraços periodicamente com álcool
- **TER OS DEVIDOS CUIDADOS COM ÁLCOOL E CHAMA**

## **Desinfectão e introdução *in vitro* de material vegetal**

### Material

Folhas de *Saintpaulia* colhidas no momento

Erlenmeyer, placas de Petri, pinças e bisturis esterilizados

Solução de Hipoclorito de sódio a 10 %

Tween 20

Água destilada esterilizada

Copos de precipitação

Meio de cultura

### **Procedimento**

- 1.1 – Após colher folhas, lavar em água corrente durante alguns minutos
- 1.2 – Na C.F.L ligada, colocar a folha, a solução desinfetante e algumas gotas de teweene 20 dentro de Erlenmeyer esterilizado. Tapar e controlar o tempo, sempre com agitação.
- 1.3 - Desprezar desinfetante
- 1.4 – Lavar com água destilada e esterilizada por três vezes
- 1.5 - Colocar a folha desinfetada em caixa de Petri
- 1.6 - Com o bisturi retirar margens da folha e desprezá-las
- 1.7 - Seccionar a restante folha em secções, fazendo-o nas nervuras
- 1.8 – Introduzir os segmentos foliares no meio de cultura, com a parte abaxial para cima
- 1.9 – Selar as caixas de Petri e/ou tubos de ensaio
- 1.10 – Colocar na Câmara de crescimento

### **Glossário**

Aclimação – Transferência das plantas das condições *in vitro* para condições autotróficas, em substrato. Necessita de controlo rigoroso de temperatura, intensidade luminosa e humidade relativa. Etapa mais difícil na maioria das espécies micropropagadas. Noutras, como é o caso de muitas ornamentais, esta etapa é simultânea com o enraizamento.

Autoclave – Dispositivo para esterilização por via húmida.

Autotrófico – Capacidade das plantas serem auto-suficientes nos processos de transformação energética, sobrevivência e aumento de biomassa. As plantas micropropagadas, por terem estomas não funcionais, estarem sujeitas a elevadas humidades relativas e altas concentrações de carbono exógeno, não têm sistemas fotossintéticos completamente funcionais, significando que dependem da sacarose/manitol fornecidos para sobreviverem.

Câmara de crescimento – Sala climatizada com controlo da intensidade luminosa, fotoperíodo e temperatura nocturna e diurna. Onde se processa o crescimento das plantas nas suas diferentes fases

Câmara de Fluxo Laminar – Equipamento que permite manipulação de meios esterilizados e material vegetal desinfetado em condições de assépcia.

Certificação – Forma de produção de plantas regulada por Legislação própria. Permite dar garantias aos produtores de que o material de propagação, vegetativo ou seminal, se encontra

livre de fungos, bactérias e vírus considerados nocivos ou de quarentena – garantia sanitária, e ainda, que esse material é de acordo com o tipo, isto é, corresponde à variedade – garantia varietal. A micropropagação enquadra-se nesta forma de produção de plantas.

Clone – Grupo de plantas pertencente à mesma variedade, com o mesmo património genético, obtidas de forma assexuada. Nesta forma de produção de plantas não há segregação e recombinação genética, sendo pois a variabilidade genética limitada. Os diferentes clones podem mostrar alguma variabilidade genética entre si, a qual pode ser identificada por recurso a marcadores moleculares e proteicos.

Cultura in vitro de plantas – Cultura de plantas em condições artificiais, por manipulação do crescimento e desenvolvimento através da introdução em meios de cultura de reguladores de crescimento. Os meios de cultura são constituídos de acordo com as referências para a espécie/variedade em causa ou de acordo com experimentação desenvolvida; as condições de fotoperíodo, temperatura, humidade relativa e concentração de CO<sub>2</sub> e outras são simuladas de acordo com as consideradas ideais para a espécie ou variedade. Na cultura *in vitro* de plantas encontram-se diferentes tecnologias entre as quais se destacam pelas suas potencialidades e aplicabilidades actuais a **micropropagação** e a **embriogénese somática**.

Desinfecção de material vegetal – Conjunto de operações pelas quais se desinfecta o material vegetal que se pretende introduzir na cultura *in vitro*. Dos materiais usuais destacam-se o hipoclorito de sódio e o bicloreto de mercúrio. Pretende-se a eliminação de fungos e bactérias à superfície sem danificar os tecidos vegetais.

Dominância apical – Dominância do último gomo – o apical, sobre todos os outros, o que faz com que, na prática, o crescimento seja vertical e não exista rebentação axilar ou adventícia enquanto esse gomo – e as auxinas que produz, não forem removidos. O crescimento na oliveira tem estas características o que faz com que a multiplicação seja feita por cortes uninodais, os quais são repicados para novos meios de multiplicação.

Embriogénese somática – Indução à formação de embriões não zigóticos a partir de tecidos vegetais indiferenciados ou directamente de tecidos vegetais diferenciados

Enraizamento bi-etápico – Forma de enraizamento da maioria das lenhosas recalcitrantes ao enraizamento. Numa primeira fase dá-se o contacto com a hormona por períodos mais ou menos curtos (10'' a dias). Depois da indução, as estacas são colocadas em meio de expressão, sem reguladores de crescimento, onde se dará o desenvolvimento das raízes.

Explant – Designação do material vegetal, qualquer que ele seja, sujeito a manipulações *in vitro*.

Indução à rizogénese – Aplicação de auxinas durante um espaço de tempo limitado para a promoção do enraizamento. Em muitas espécies, sobretudo nas não lenhosas, a indução é simultânea com a expressão da rizogénese.

Isenção de bacteriose e vírus – A cultura *in vitro* de tecidos vegetais é actualmente a única forma de obter plantas isentas de viroses e bacterioses. A existência de regulamentação, europeia e nacional, que legisla o estado sanitário de material de propagação no quadro da

certificação de plantas faz com que, muitos obtentores de material vegetal não conforme com a regulamentação recorra a estas técnicas para a recuperação do material vegetal infectado e posterior colocação nos circuitos comerciais.

Meio de cultura – Meio nutritivo onde crescem as plantas. Constituído, de acordo com as exigências específicas da espécie ou da variedade, por macro e micro elementos, ferro, vitaminas, sacarose ou outra fonte de carbono, agar e reguladores de crescimento, entre outros elementos. Para a sua assimilação efectiva por parte das plantas é necessário que o pH do meio esteja corrigido para a planta cultivada.

Micropropagação – Propagação *in vitro* de plantas

Recalcitrante – Expressão usada para designar falta de apetência para uma determinada função. No caso do enraizamento diz-se que uma planta é recalcitrante quando apresenta taxas de enraizamento muito baixas para qualquer forma e tipo de auxina aplicada.

Reguladores de crescimento (RC) – Equivalentes a hormonas nos animais. Funções reguladoras e diferenciadoras nos tecidos vegetais. Os principais reguladores de crescimento utilizados na micropropagação são as auxinas e as citocininas, isoladamente ou em conjunto:

Auxinas – Grupo de RC responsáveis, entre outros processos, pela rizogénese. AIB (Ácido Indol Butírico) é o mais utilizado no enraizamento de lenhosas *in vitro*.

Citocininas – Grupo de RC responsáveis pela multiplicação celular e desenvolvimento de rebentação. BAP (Benzilaminopurina); Zeatina são algumas das citocininas usadas na cultura *in vitro*.

Repicagem – Operação efectuada em condições de assépcia em CFL, na qual se transferem plantas de um meio de cultura para outro. No caso da oliveira esta operação é feita entre cada fase com o intervalo de um mês.

Totipotência – Capacidade de qualquer célula vegetal, qualquer que seja a sua origem ou idade, de poder originar todo o conjunto de células e tecidos que formam uma planta. É com base nesta capacidade que se constituem todas as tecnologias da cultura *in vitro* de tecidos vegetais. Mesmo as células maduras podem ser desprogramadas geneticamente noutras, num processo que se chama desdiferenciação, permitindo depois a sua reprogramação no sentido da formação dos órgãos que se pretende.