

***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

Cultivo in vitro de plantas

3ª edição ampliada

L. Pedro Barrueto Cid

Editor Técnico

Embrapa
Brasília, DF
2014

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Parque Estação Biológica (PqEB),
Av. W5 Norte (final)
CEP 70770-900 Brasília, DF
Caixa Postal 02372
Fone: (61) 3448-4700
Fax: (61) 3340-3624
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Unidade responsável pelo conteúdo

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Comitê de Publicações da Embrapa Recursos
Genéticos e Biotecnologia

Presidente

Maria Isabela Lourenço Barbirato

Secretário-Executivo

Thales Rocha Lima

Membros

Jonny Everson Scherwinski Pereira

Lucília Helena Marcellino

Lígia Sardinha Fortes

Marcio Sanches

Samuel Resende Paiva

Vânia Cristina Rennó Azevedo

Suplentes

Daniela Aguiar de Souza Kols

João Batista Tavares da Silva

1ª edição

1ª impressão (2010): 1.000 exemplares

2ª edição

E-book (2013)

3ª edição

1ª impressão (2014): 1.000 exemplares

Embrapa Informação Tecnológica

Parque Estação Biológica (PqEB),
Av. W3 Norte (final)
CEP 70770-901 Brasília, DF
Fone: (61) 3448-4236
Fax: (61) 3448-2494
www.embrapa.br/livraria
livraria@embrapa.br

Unidade responsável pela edição

Embrapa Informação Tecnológica

Coordenação editorial

Selma Lúcia Lira Beltrão

Lucilene Maria de Andrade

Nilda Maria da Cunha Sette

Supervisão editorial

Juliana Meireles Fortaleza

Revisão de texto

Jane Baptistone de Araújo

Maria Cristina Ramos Jubé

Normalização bibliográfica

Celina Tomaz de Carvalho

Iara Del Fiaco Rocha

Tradução dos capítulos 3 e 5

L. Pedro Barrueto Cid

Projeto gráfico, editoração eletrônica e
tratamento de imagens

Júlio César da Silva Delfino

Paula Cristina Rodrigues Franco

Capa

Paula Cristina Rodrigues Franco

Ilustração da capa

Embriões zigóticos de café tratados com
tetrazólio – *L. Pedro Barrueto Cid*

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Informação Tecnológica

Cultivo in vitro de plantas / L. Pedro Barrueto Cid, editor técnico. 3. ed. ampl. – Brasília, DF : Embrapa, 2014.
325 p. : il. color. ; 16 cm x 22 cm.

ISBN 978-85-7035-379-5

1. Cultura in vitro. 2. Cultura de tecido. 3. Micropropagação. I. Cid, L. Pedro Barrueto. II. Embrapa
Recursos Genéticos e Biotecnologia.

CDD 581.0724

© Embrapa 2014

Apresentação

A cultura de tecidos hoje no Brasil é uma realidade não apenas em muitos laboratórios acadêmicos, senão também em empresas privadas, bem articuladas comercialmente e relacionadas com culturas de importância econômica, tais como: cana-de-açúcar, flores, eucaliptos e pinheiros.

A literatura internacional sobre a matéria informa-nos de que a cultura de tecidos de planta, ou micropropagação, movimentava bilhões de dólares em todo o mundo, notadamente na Alemanha, na Holanda, na Inglaterra, na Índia, nos EUA, e em outros países. Assim, esse método tem aquecido os mercados e vem promovendo a criação de novos laboratórios, empregos, tecnologias e patentes. Além disso, a micropropagação tem fortalecido novos paradigmas por meio do uso da biologia molecular, com vistas na obtenção de plantas mais resistentes, produtivas, aromáticas ou coloridas, dentro de uma visão mais moderna e dinâmica do agronegócio internacional.

Ademais, no mundo acadêmico, a cultura de tecidos, desde muito tempo, tem dado suporte a muitas e diferentes linhas de pesquisa envolvendo inúmeras teses de pós-graduação nas áreas da genética, da fisiologia de plantas, da fitopatologia, da fitotecnia, etc. Mais tarde, esses conhecimentos constituíram o arcabouço de muitos avanços tecnológicos, como a descoberta das citocininas, dos protoplastos, dos haploides, a limpeza clonal, o aprimoramento de meios nutritivos, o uso de biorreatores, os protocolos de micropropagação, etc.

No Brasil, a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia apresenta-se não somente como um centro de referência nacional e internacional nessa área, mas também como um centro pioneiro com foco na biotecnologia agrária e florestal. Por isso, ela não poderia deixar de patrocinar um livro a respeito desse assunto,

que envolve os aspectos mais importantes da cultura de tecidos. Para tanto, foram convidados especialistas destacados dessa área do conhecimento.

Todos os participantes desta obra esperam que este livro tenha boa acolhida entre os profissionais e os estudantes dessa disciplina, o que representará um grande estímulo para nós, bem como uma grande recompensa pelo esforço desenvolvido.

L. Pedro Barreto Cid
Editor Técnico

Prefácio

Satisfaz-nos, profundamente, lançar esta nova edição do livro *Cultivo in vitro de plantas*, em função da boa acolhida que teve a primeira edição e seu rápido esgotamento de livraria, fato este que ultrapassou nossas expectativas de demanda.

Nossa obra foi um esforço didático e profissional em prol da informação simples e efetiva para estudantes e professores ligados à área de biotecnologia botânica e agronômica deste País-continente, que ainda tem fronteira agrícola por desbravar.

Já estamos iniciando o terceiro milênio, e, cada vez mais, a imprensa inunda nossos ouvidos com conceitos como economia verde, desenvolvimento sustentável, clonagem de plantas, resistência a pragas e enfermidades, a fim de cobrar inovação, produtividade e eficiência no âmbito do agronegócio nacional, para produzir e exportar alimentos com valor agregado, questão esta que a Embrapa não perde de vista.

Dessa forma, e sem pretender esgotar o tema, nosso livro apresenta uma variedade de tecnologias na área biotecnológica de plantas, inclusive com um capítulo novo sobre protoplastos, justamente para um melhor aporte a nossos leitores interessados.

Finalmente, esperamos que esta edição, que a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia tão apropriadamente ajudou a germinar, seja tão bem-vinda como a anterior, para que possa fortalecer o espírito de todos os participantes desta obra, no sentido de que o esforço realizado não foi em vão.

L. Pedro Barrueto Cid
Editor Técnico

Sumário

Capítulo 1

Explante, meio nutritivo, luz e temperatura, 17

- Explante, 19
- Assepsia, 21
- Meio nutritivo, 27
 - Sacarose, 29
 - Vitaminas, 30
 - Inositol, 31
 - Hormônios, 31
 - Misturas complexas, 39
 - Ágar, 39
 - Carvão ativado (CA), 40
 - Luz, 41
- Temperatura, 44
- Referências, 45

Capítulo 2

Oxidação fenólica, vitrificação e variação somaclonal, 53

- A oxidação fenólica, 53
- Vitrificação ou hiper-hidricidade, 56
- Variação somaclonal, 58
- Referências, 64

Capítulo 3

Embriogênese somática, 69

- Definição, usos e limitações, 69
- Fases e formas no desenvolvimento de embriões somáticos, 72

Características de células somáticas
embriogênicas e embriões, 76
Fatores que controlam ou afetam a morfogênese da ES, 78
Precondicionamento, 78
 Estresse, 78
 Reguladores de crescimento, 80
 Genes e proteínas, 84
 Compostos extracelulares excretados
 para o meio de cultivo, 87
Referências 88

Capítulo 4

Organogênese, 105

Organogênese direta versus organogênese indireta, 106
A organogênese e o balanço hormonal, 110
Cauligênese, 114
Rizogênese, 117
 Florescimento, 119
 Composição dos meios de cultivo para a
 organogênese, 121
Conclusão, 123
Referências, 124

Capítulo 5

Poliembriogênese, 131

Apomixia e poliembrionia, 133
Totipotencialidade e morte celular, 134
Modelos de desenvolvimento na poliembriogênese, 134
Embriogênese somática e
poliembriogênese em coníferas, 141

Especificidade de diagnósticos e
criopreservação de genótipos, 142
Protoplastos e engenharia genética, 145
Poliembrionia em sementes e fatores ambientais, 145
Protocolo para *Pseudosuga menziesii*, 147
Ganhos genéticos em florestas clonais, 147
Desafios futuros, 149
Referências, 150

Capítulo 6

Biorreatores para produção de mudas em larga escala, 159

Constituição básica dos biorreatores, 161
Principais tipos de biorreatores utilizados para cultivo
de hastas caulinares e de embriões, 162
 Biorreatores do tipo aerador agitador
 (*aeration agitation bioreactor*), 162
 Biorreator do tipo tambor rotatório
 (*roller drum bioreactor*), 162
 Biorreator do tipo filtro rotatório
 (*spin filter bioreactor*), 163
 Biorreator do tipo borbulhamento
 (*air driven bioreactor*), 163
 Biorreator do tipo levantamento de ar
 (*air lift bioreactor*), 163
 Biorreator do tipo fase gasosa
 (*gaseous phase bioreactor*), 164
 Biorretor de aeração por membrana porosa ao oxigênio
 (*oxygen permeable membrane aerator bioreactor*), 164
 Biorreator do tipo sobreaeração
 (*overlay aeration bioreactor*), 165

Biorreator de imersão temporária,	165
Biorreator de imersão temporária (modelo da Embrapa),	168
Vantagens do uso de biorreatores em relação ao processo de micropropagação convencional,	169
Características do equipamento,	170
Descrição do equipamento,	170
Funcionamento do equipamento,	171
Uso do biorreator na produção de mudas de abacaxi,	172
Produção de mudas em um kit de biorreator de 40 pares de frascos,	173
Número necessário de gemas para produção de 20 mil mudas em biorreator,	174
Referências,	175

Capítulo 7

Conservação in vitro de recursos genéticos

de plantas: estratégias, princípios e aplicações, 179

A conservação dos recursos genéticos vegetais,	182
Limitações associadas aos métodos convencionais de conservação de recursos genéticos de plantas,	183
Preservação de sementes,	183
Conservação em campo,	184
Estratégias de conservação in vitro de recursos genéticos de plantas,	185
Sistemas de crescimento lento (crescimento mínimo),	188
Estudos fisiológicos e moleculares relacionados à conservação in vitro de germoplasma,	221
Estudos fisiológicos,	224

Estabilidade genética, 224
Considerações finais a respeito da aplicação
de técnicas in vitro para conservação
de recursos genéticos vegetais, 226
Referências, 228

Capítulo 8

O diagnóstico molecular aplicado à cultura de tecidos vegetais, 237

Variação somaclonal, 239
Detecção de plantas transgênicas, 241
Referências, 247

Capítulo 9

Introdução de genes em células vegetais mediada pelo processo biobalístico, 249

O processo biobalístico, 249
Sistemas, 252
As micropartículas, 255
Parâmetros físicos importantes, 257
Desenho de vetores, 259
Transformação via bombardeamento de meristemas
apicais, 260
Transformação cloroplasmática, 263
Inoculação de vírus e de viroides, 264
Diolística, 265
Referências, 266

Capítulo 10

Protoplastos: tecnologia e aplicações, 277

Introdução, 277

Isolamento e cultivo de protoplastos, 278

Hibridação somática, 281

Transformação genética de protoplastos, 285

Outras aplicações e perspectivas, 287

Referências, 288

Capítulo 11

O sistema *Agrobacterium*: do solo para o laboratório, 297

O gênero *Agrobacterium*, 298

Ocorrência da doença, 300

Biologia do processo infeccioso, 301

 A atração, 301

 O plasmídeo Ti, 304

 A ativação do regulon *vir*, 305

 A síntese da fita-T, 306

 O movimento intercelular do complexo-T, 307

 O movimento intracelular do complexo-T, 309

 A integração da fita-T no genoma da planta, 310

 A expressão dos genes do T-DNA, 312

Agrobacterium como vetor de transformação de plantas, 314

Sistema de transformação via *Agrobacterium*, 315

Referências, 317

Explante, meio nutritivo, luz e temperatura

*L. Pedro Barrueto Cid
João Batista Teixeira*

Do ponto de vista biológico, os organismos vivos reproduzem-se sexual ou assexuadamente. No primeiro caso, a variabilidade genética e a evolução são favorecidas; no segundo, isso não acontece.

Nas plantas superiores, a reprodução assexuada pode ocorrer por meio de vários processos, tais como: o enraizamento de estacas, a enxertia, a apomixia e a micropropagação.

Do ponto de vista comercial, é interessante que cultivares de importância agrônômica sejam propagadas assexuadamente, pois esse tipo de propagação resulta em plantas uniformes quanto ao seu fenótipo (crescimento, floração, frutificação, etc.). Isso decorre do fato de que essas plantas são altamente selecionadas para características desejadas (alta produção, resistência a doenças, etc).

Por via sexual, a conservação dessas características poderia ser obtida por endogamia, ou seja, pelo cruzamento entre indivíduos