

CAPÍTULO 7

**Cultivo *in vitro* de plantas aplicado à
conservação de recursos genéticos**

Marlene Pires Moreira

Francis Julio Fagundes Lopes

Livia Cristina da Silva

Introdução

A cultura de tecidos vegetais consiste em uma série de protocolos que permite a multiplicação em grande escala de plantas na condição *in vitro* (ou seja, em laboratório), sendo uma das formas de conservação *ex situ* de germoplasmas de plantas (SARASAN et al., 2006). Os primeiros estudos sobre o cultivo *in vitro* datam de 1902, quando Gottlieb Haberland (2003) propôs a hipótese da totipotência celular, segundo a qual toda célula vegetal possui a integridade da informação genética necessária para formar tecidos, órgãos e até mesmo regenerar a planta completa. O material vegetal com capacidade proliferativa (explante), quando em condições de assepsia, temperatura, umidade e luminosidade controladas, originará uma plântula com raízes e brotos sob o estímulo adequado de reguladores de crescimento (substâncias análogas aos hormônios vegetais), que são adicionados a um meio de cultivo de composição definida. A capacidade organogênica do explante está relacionada à presença de populações de células sensíveis aos reguladores de crescimento.

A conservação de germoplasmas por cultivo *in vitro* é indicada, principalmente, para espécies nativas ou exóticas, cujas sementes são recalcitrantes ou intermediárias, com um longo período juvenil (que demoram a produzir sementes), que possuem alta heterozigosidade ou propagação vegetativa. A conservação *ex situ* por meio do cultivo *in vitro* reduz o risco da perda de clones por intempéries, desastres ambientais ou ataque de pragas e patógenos (MATSUMOTO; CARDOSO; SANTOS, 2010).

Fatores endógenos, como genótipo, condições fisiológicas da planta matriz e idade do órgão doador de explantes, bem como exógenos (época da coleta, composição do meio de cultivo e condições da sala de crescimento), influenciam o sucesso do cultivo *in vitro* (MURASHIGE, 1974). Diante das dificuldades relacionadas à manutenção de germoplasmas por cultivo *in vitro*, citam-se: demanda por recursos humanos qualificados; manutenção constante das boas condições na sala de crescimento, como luz, temperatura e assepsia adequadas; ocorrência de alterações epigenéticas no material após várias repicagens; hiperidricidade; e estabelecimento de protocolos adequados à espécie de interesse.

Não obstante, a conservação de germoplasmas por cultivo *in vitro* tem sido operacionalizada com espécies nativas e cultivadas em laboratórios de universidades, empresas e institutos de pesquisa. Isso decorre de seu grande potencial em termos de conservação de recursos genéticos para diversos estudos, incluindo os de micropropagação de espécies nativas ameaçadas de extinção em projetos de resgate de populações vegetais em ambientes degradados, micropropagação de espécies frutíferas e ornamentais, triagem e produção de metabólitos secundários promissores para a produção de fármacos, cosméticos e defensivos agrícolas, obtenção de mudas livres de patógenos (limpeza clonal), além de diversas pesquisas na área de melhoramento genético vegetal.

Etapas da cultura de tecidos vegetais

Os materiais vegetais com potencial morfogenético – isto é, capazes de iniciar uma cultura de tecidos – incluem

sementes, bulbos, miniestacas, embriões, pólen, óvulos, tecidos e células somáticas. Esses materiais podem servir de fonte para a obtenção de explantes, pequenos segmentos retirados de uma planta matriz para iniciar o protocolo de micropropagação.

A regeneração de órgãos e plantas inteiras *in vitro* se fundamenta em três pilares: totipotência celular, desdiferenciação e balanço hormonal. Totipotência é a capacidade que toda célula vegetal tem, sob estímulos apropriados, de regenerar tecidos, órgãos e a planta completa (TORRES; CALDAS; BUZZO, 1998). Já a desdiferenciação consiste em uma célula já diferenciada regressar ao estágio meristemático, redefinir novas rotas metabólicas e se diferenciar novamente, assumindo novas funções no contexto dos tecidos e órgãos regenerados. Por fim, o balanço hormonal corresponde, fundamentalmente, ao equilíbrio das concentrações de auxinas e citocininas no meio, o que é fundamental para o desenvolvimento vegetal (CID, 2014).

Em alguns casos, algumas células do explante podem retornar a um estado extremamente indiferenciado e altamente proliferativo, dando origem aos calos. Estes podem seguir duas rotas distintas, originando diretamente raízes e brotos – os chamados calos organogênicos –, ou dar origem a embriões, que, por sua vez, são embriogênicos. As etapas da micropropagação *in vitro* de plantas estão resumidas na Figura 1.

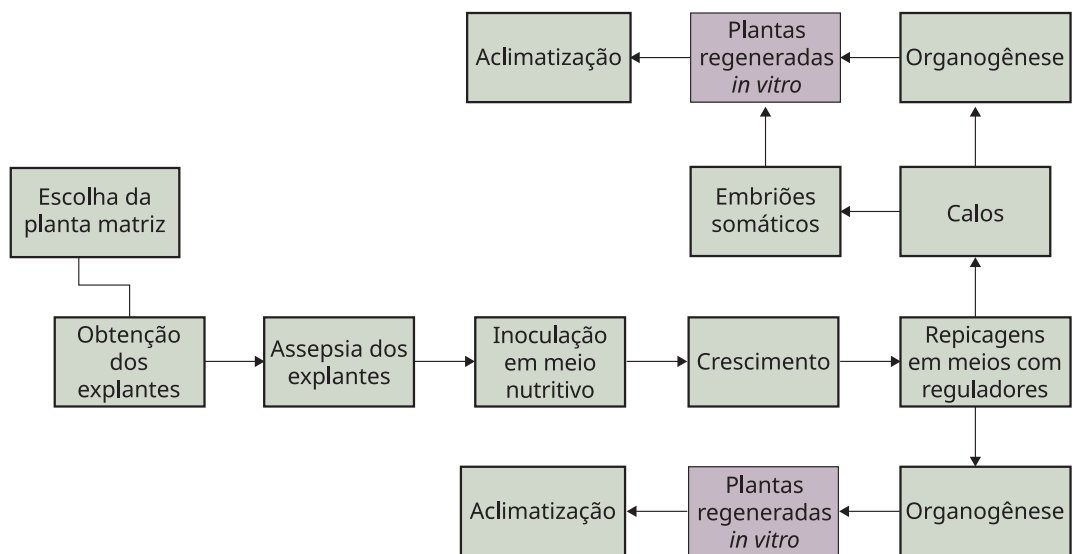


Figura 1: Etapas da micropropagação *in vitro*

Fonte: elaborada pelos autores.

Escolha da planta matriz

A escolha da planta matriz é uma etapa fundamental para o sucesso do cultivo *in vitro*, uma vez que as plantas produzidas são clones da planta doadora dos explantes. Portanto, a planta matriz deve apresentar boas condições morfológicas e fisiológicas. Tecidos meristemáticos e mais jovens, oriundos da planta doadora, apresentam maior capacidade de regeneração (TORRES; CALDAS; BUZZO, 1998).

Quando um explante é colocado em um meio de cultivo, ele pode regenerar plantas completas por meio de dois processos: organogênese ou embriogênese somática. Na embriogênese, células somáticas darão origem a um embrião sem a ocorrência da fusão de gametas. A organogênese surge como resposta a ferimentos no explante e pode ser classificada em direta ou indireta. Na organogênese direta, uma planta

completa é regenerada diretamente do explante. Gemas e brotações surgem a partir de tecidos – câmbio vascular, base do pecíolo em dicotiledôneas, base de folhas e escamas em bulbos de monocotiledôneas, segmentos de raízes, entre outros – que apresentam potencial morfogenético na planta *in vivo*, mas que, em geral, não se expressam. Na organogênese indireta, primeiramente são formados os calos, que podem originar brotos, utilizados para regenerar plantas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). A partir do calo, também é possível obter linhas celulares cultivadas em meio líquido, dando origem ao cultivo de suspensões celulares. Essas suspensões podem ser utilizadas para produzir metabólitos secundários ou células desprovidas de parede celular, denominadas protoplastos.

Assepsia dos explantes

A contaminação dos explantes por microrganismos é um dos maiores entraves para a cultura de tecidos *in vitro* (Figura 2). A etapa da assepsia é realizada logo após a coleta do material da planta matriz, utilizando substâncias germicidas para impedir que os microrganismos (bactérias e fungos) se desenvolvam nos frascos de meio de cultura, inviabilizando o cultivo.

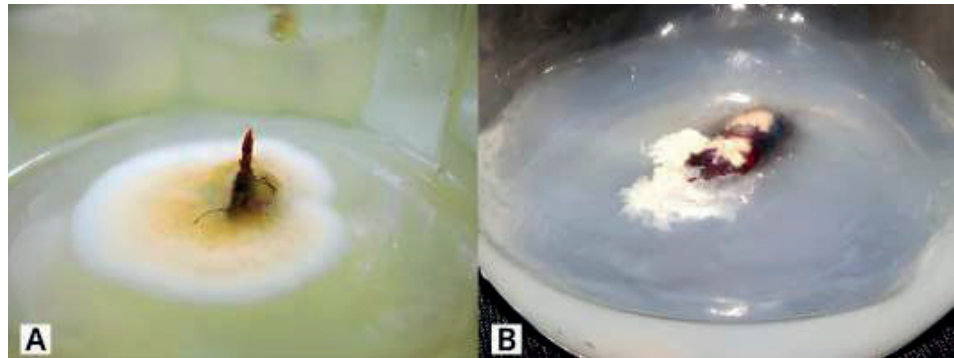


Figura 2: Contaminação em cultura de tecidos. Na porção “A”, fungo em semente de cagaita (*Eugenia dysenterica*). Na “B”, bactéria em semente de baru (*Dipteryx alata*)

Fonte: fotos tiradas por Livia Cristina da Silva no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal de Goiás (UFG) em 2012.

No primeiro passo da assepsia, o explante é lavado em água com detergente (comercial ou Tween 20). Esse procedimento remove sujeiras e rompe a tensão superficial do material, melhorando a interação com os germicidas. Dos compostos com ação germicida, os principais utilizados são etanol, hipoclorito de sódio ou de cálcio, cloreto de mercúrio, ácido clorídrico e isopropanol. O tempo de imersão, a concentração e o tipo de germicida variam com a espécie vegetal e o tipo de explante (JUNGHANS; SOUZA, 2009). Todo o processo de assepsia e repicagem é realizado em câmara de fluxo laminar, um ambiente livre de contaminantes do ar. Após o tratamento com germicidas, os explantes são lavados em água destilada, esterilizada para a remoção de resíduos químicos que possam interferir na regeneração *in vitro*.

Inoculação dos explantes em meio nutritivo

Os meios de cultivo de tecidos vegetais fornecem elementos para o desenvolvimento e regeneração de tecidos, e seus

componentes são classificados em essenciais e opcionais. Os componentes essenciais são água, sais minerais e fontes de carbono, enquanto os opcionais são inositol, agentes geleificantes, reguladores osmóticos, antioxidantes e elicitores (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; CID, 2014; SOUZA; RESCAROLLI; NUNEZ, 2018).

A água possibilita o transporte dos nutrientes para os tecidos vegetais e participa dos processos de divisão e crescimento celular, bem como de processos químicos e bioquímicos (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007). A água utilizada deve ser destilada e esterilizada para maior controle das características do meio de cultivo (TORRES; CALDAS; BUZZO, 1998).

Os sais minerais (macro e micronutrientes) são requeridos nos mais diversos processos vitais do vegetal. Os macronutrientes são requeridos em maior abundância nas plantas, como o carbono, oxigênio, hidrogênio, nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre. Os micronutrientes são requeridos em baixas concentrações (miligramas ou microgramas por litro de meio). São eles: boro, cloro, cobre, ferro, manganês, molibdênio, níquel e zinco (MALAVOLTA, 2006; WARAICH et al., 2011). Elementos minerais considerados não essenciais possuem efeito benéfico no desenvolvimento de certas espécies, como cobalto, selênio, níquel e silício (FAQUIN, 2005).

Os componentes orgânicos do meio incluem os carboidratos, vitaminas e reguladores de crescimento. Os carboidratos são usados na respiração para produção de energia e construção de intermediários metabólicos. Os mais usados no

cultivo *in vitro* são: sacarose, glicose e frutose, geralmente na concentração de 2 a 5% (p/p) (PAIVA; PAIVA, 2001b). As vitaminas são utilizadas em baixas concentrações e regulam o metabolismo celular. As vitaminas hidrossolúveis (grupo B), são geralmente utilizadas, sendo elas tiamina (B1), riboflavina (B2), piridoxina (B6), ácido pantotênico (B5), ácido nicotínico (B3), ácido fólico (B9), biotina (B7), cobalamina (B12) e o ácido ascórbico (vitamina C) (CID, 2014).

Os fitorreguladores são moléculas sintéticas que, em pequenas concentrações, promovem, inibem ou modificam processos fisiológicos na planta. Os equivalentes naturais são os hormônios vegetais, que induzem respostas fisiológicas de crescimento e diferenciação celular (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007). A concentração adequada de cada classe de fitorreguladores, sozinha ou em combinação, pode suprir possíveis deficiências endógenas do explante. Os principais grupos de reguladores utilizados são as auxinas e as citocininas, e, em menor frequência, giberelinas, etileno, ácido abscísico (ABA), ácido jasmônico, poliaminas e brassinosteróides (CID, 2005, 2014).

As auxinas participam da regulação do crescimento geral da planta. Em baixas concentrações, promovem crescimento radicular e, em altas concentrações, inibem o crescimento das raízes. As citocininas regulam muitos processos na planta, entre eles: divisão celular, morfogênese, maturação de cloroplastos, crescimento celular e senescência, além de influenciarem na taxa de síntese proteica nas células (TAIZ et al., 2017). O efeito combinado de diferentes concentrações de auxinas e citocininas no meio de cultivo pode surtir

diferentes resultados na regeneração de órgãos, posto que altas concentrações de auxinas e baixas concentrações de citocininas induzem o enraizamento dos explantes, enquanto a relação inversa promove a formação de parte aérea (CID, 2005).

Os componentes opcionais podem ter importância específica no cultivo de algumas espécies. O inositol participa do metabolismo de compostos poli-hídricos nas plantas, germinação de algumas sementes, transporte de açúcares, metabolismo de parede celular, estresse fisiológico, entre outros (PAIVA; PAIVA, 2001a). Já os compostos geleificantes dão suporte físico aos explantes durante o cultivo, e o mais utilizado deles é o ágar, o qual pode ser substituído por gelrite ou phytigel (TORRES; CALDAS; BUZZO, 1998). Os reguladores osmóticos reduzem as taxas de crescimento das plantas, removendo o excesso de água intracelular, por gradiente osmótico, sendo muito utilizados para a conservação *in vitro* por longos períodos (FLORES et al., 2013). Os osmorreguladores mais utilizados são a sacarose, o manitol e o sorbitol. Os antioxidantes previnem ou minimizam a oxidação que ocorre nos tecidos após o corte realizado nos subcultivos, principalmente em espécies com maior teor endógeno de taninos ou hidroxifenóis. Os principais antioxidantes utilizados no meio de cultivo são: carvão ativado, cisteína, polivinilpirrolidona (PVP), ácido ascórbico e ácido cítrico (GUERRA et al., 2016). Elictores podem desencadear uma série de reações bioquímicas que culmina na maior ou menor produção de metabólitos secundários em resposta ao estímulo recebido (VERPOORTE; MARASCHI, 2001). Elictores bióticos adicionados ao meio de cultivo induzem a biossíntese de fitoalexinas. Quitosanas, micélios de fungos

fitopatogênicos e extratos de proteínas são alguns exemplos de elicitores bióticos (SOUZA, 2005). Elicitores abióticos não derivam de outros organismos e podem ser de natureza física ou química, como choque térmico, adição de metais pesados ao meio de cultivo, aumento da luz incidente, mudanças na qualidade espectral da luz, aumento ou diminuição do pH ideal do meio ou restrição de elementos no meio de cultivo (DONG; ZHONG, 2001; SALDANHA et al., 2013).

Por fim, outro fator importante é o pH dos meios de cultura, que deve ser levemente ácido (entre 5 e 6), porque é a faixa em que ocorre maior biodisponibilidade de nutrientes. Meios com pH abaixo de 5 tendem a apresentar hidrólise de polissacarídeos, ao passo que meios com pH acima de 6 tendem a apresentar precipitação de sais (GEORGE, 1996; TORRES; CALDAS; BUZZO, 1998).

Crescimento

O crescimento da planta no meio de cultivo pode ser classificado em heterotrófico, mixotrófico ou fotomixotrófico, sendo os dois últimos os mais comuns, uma vez que a planta utiliza tanto carbono inorgânico (CO₂) quanto orgânico (adicionado ao meio) para crescer. O crescimento do tipo fotomixotrófico tem sido apontado como mais benéfico em termos de arquitetura e fisiologia das mudas *in vitro*, pois resulta em maiores taxas de sobrevivência na fase de aclimatação (SILVEIRA; LOPES; SIBOV, 2020). Após a inoculação dos explantes no meio de cultivo, os frascos são vedados para garantir um ambiente estéril. O tipo de vedação pode ou não permitir trocas gasosas entre o material vegetal e o meio externo, dependendo da

finalidade do cultivo e da resposta da planta (SILVEIRA; LOPES; SIBOV, 2020). Os frascos são, então, mantidos sob condições controladas de luz e temperatura que variam de acordo com a espécie (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Após o período de incubação e crescimento das mudas, é realizado o estabelecimento de subculturas. Para isso, as plantas retornam à câmara de fluxo laminar para serem repicadas (segmentadas) e cada segmento (novo explante) é inoculado em um novo meio de cultura com hormônios para induzir a brotação e o enraizamento (Figura 3).

É muito importante realizar a revitalização para acessos que permaneçam na condição *in vitro* por muito tempo e que já passaram por muitos subcultivos sucessivos. Isso é feito pela reintrodução do material em casa de vegetação ou campo, de maneira a permitir a reativação de seu metabolismo em todos os níveis. A partir do(s) material(is) revitalizado(s) que apresenta(m) crescimento e desenvolvimento dentro dos padrões esperados, novos explantes são retirados para dar origem a uma nova cultura *in vitro*.



Figura 3: Multiplicação e enraizamento em *Lomatozona artemisiifolia*. Na porção "A", explantes inoculados em meio de cultura contendo ANA (Ácido Naftaleno Acético) e BAP (Benzilaminopurina); no "B", microbrotos formados nos explantes; e no "C", enraizamento da planta

Fonte: fotos tiradas por Marlene Pires Moreira no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da UFG em 2017.

Aclimatização

É um termo utilizado em cultura de tecidos para definir a etapa da micropropagação, que envolve a transferência da planta cultivada *in vitro* para a casa de vegetação (HOFFMANN, 2002), na qual serão cultivadas em substratos específicos para cada espécie (Figura 4). Nessa etapa, o risco de perder muitas mudas é alto devido às mudanças nas condições de crescimento, pois a planta deixa um ambiente estéril, sendo introduzida em um ambiente em que está sujeita ao ataque de microrganismos, necessitando desenvolver seus próprios mecanismos de defesa. Também deixa seu estado heterotrófico ou mixotrófico e precisa ativar seu aparato fotossintético, tornando-se autotrófica. As condições de temperatura,

luminosidade e umidade variam muito em relação ao seu ambiente prévio (condição *in vitro*), aumentando as taxas de transpiração e deixando a planta vulnerável ao estresse hídrico e luminoso.



Figura 4: *Lomatozona artemisiifolia* aclimatada após micropropagação

Fonte: fotos tiradas por Marlene Pires Moreira nas casas de vegetação da Escola de Agronomia da UFG em 2017.

A aplicação exógena de ABA durante o cultivo *in vitro* pode melhorar a resposta adaptativa das plantas na fase de aclimatização, reduzindo as taxas transpiratórias, mesmo que as plantas recém-retiradas da condição *in vitro* apresentem estômatos não funcionais (RAI et al., 2011).

O tipo de substrato utilizado também contribui para o sucesso nessa etapa. Cada espécie possui diferentes demandas nutricionais e hídricas, sendo necessário estabelecer o melhor substrato para obter o maior número de plantas aclimatadas.

Fatores que interferem no cultivo *in vitro*

O sucesso do cultivo *in vitro* depende de condições externas controladas, bem como do estado fisiológico e fitossanitário do explante utilizado. A seguir, discutiremos em mais detalhes os principais fatores que devem ser considerados para o estabelecimento de um protocolo de cultivo *in vitro* de plantas.

Luz e temperatura

A luz é fundamental para a fotossíntese e para a fotomorfogênese das plantas (GENOUD et al., 1999). Tanto a qualidade espectral quanto o fotoperíodo influenciam o crescimento e desenvolvimento, interferindo na quantidade e proporção de clorofilas a, b e carotenóides, número de brotações e comprimento de caule (TAIZ et al., 2017). As plantas apresentam exigências diferenciadas em relação ao fotoperíodo, mas a maioria das espécies se desenvolve bem com 16 horas de incidência luminosa e mil *lux* de intensidade luminosa na condição *in vitro* (PAIVA; PAIVA, 2001a).

Na cultura de tecidos, geralmente se utiliza uma temperatura constante, por volta de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Na natureza, as plantas não crescem a uma temperatura constante e isso influencia a morfogênese vegetal. Portanto, adaptações na temperatura podem ser requeridas dependendo das espécies estudadas.

Hiperidricidade (vitrificação)

A hiperidricidade ou vitrificação ocorre quando a planta apresenta um acúmulo anormal de água no interior das suas

células e tecidos, exibindo um aspecto translúcido e quebradiço (KEVERS et al., 2004). Essa condição do explante tem relação com altas temperaturas, baixa intensidade luminosa e alta umidade relativa no interior do frasco de cultivo. Esse fenômeno é reversível, com a transferência para um novo meio de cultura e uma maior atenção a todos os componentes e condições de cultivo (SANTOS et al., 2001). A transferência da planta para um sistema de cultivo fotomixotrófico pode favorecer a redução da umidade excessiva dentro dos frascos de cultivo, bem como a possibilidade de melhoria geral da arquitetura da plântula (SILVEIRA; LOPES; SIBOV, 2020).

Variação somaclonal

Uma planta mantida em condição *ex situ*, particularmente na condição *in vitro*, pode, eventualmente, apresentar variações somaclonais, ainda que todas sejam clones de uma mesma planta matriz. Essas alterações podem ser de natureza genética ou epigenética e são mais comuns após sucessivas repicagens e passagens por meios de cultura contendo os reguladores de crescimento.

As variações somaclonais de natureza genética ocorrem diretamente no DNA, em decorrência da quebra de cromátides, migrações desequilibradas de cromossomos na mitose, inversões, deleções, translocações, enfim, alguma mutação no DNA de causa desconhecida transmitida às próximas gerações (BAIRU; AREMU; VAN STADEN, 2011).

As variações somaclonais de natureza epigenética levam a variações fenotípicas sem alterações nas sequências dos

nucleotídeos. Nas alterações epigenéticas, as mudanças fenotípicas resultam de alterações espontâneas ou induzidas nos padrões de expressão de genes devido a mudanças no padrão de metilações do DNA (CID, 2014) ou nas metilações/acetilações das histonas (STELPFLUG et al., 2014; TRICKER et al., 2012; KAEPLER; RHEE; KAEPLER, 2000; KITIMU et al., 2015). Também é possível que uma alteração epigenética desencadeie uma alteração genética na sequência de DNA, resultando em variantes somaclonais. Um exemplo disso é a reativação de elementos transponíveis por meio da perda de metilação do DNA na região genômica em que eles estejam inseridos. Os saltos dos elementos transponíveis podem ser tanto para dentro quanto para fora de sequências de DNA codificante ou regulatório. Eventualmente, esse evento pode alterar a sequência de nucleotídeos do sítio e/ou do sítio receptor do elemento transponível, dependendo do tipo de elemento em questão (SMULDERS; DE KLERK, 2011; ZAKRZEWSKI et al., 2017). Situações que gerem estresse à planta no cultivo *in vitro* podem desencadear o surgimento de variantes somaclonais. Vários subcultivos de tecidos meristemáticos, expostos a altas temperaturas por um longo período de tempo, por exemplo, aumentam as chances das variantes surgirem (PRADO et al., 2010).

Essas variações durante o cultivo *in vitro* são indesejáveis à obtenção de clones com características superiores, selecionadas anteriormente ao cultivo. No entanto, elas podem, principalmente as herdáveis, manifestar-se em plantas raras e induzir o surgimento de alguma característica de interesse (RIBEIRO, 2012).

Cultivo *in vitro* aplicado à conservação de recursos genéticos vegetais

A conservação dos recursos genéticos por meio de uma coleção de germoplasmas de cultivo *in vitro* requer técnicas que minimizem os riscos advindos do longo período de armazenamento, o que pode acabar inativando alguns processos metabólicos de natureza vital na planta. Nesse sentido, o uso de meios de crescimento mínimo ou a criopreservação visam diminuir ao máximo o metabolismo da coleção de germoplasmas (CID, 2014).

Crescimento lento ou mínimo é o método utilizado na conservação de plantas *in vitro*, que consiste em reduzir o metabolismo das plantas para prolongar ao máximo o intervalo entre os subcultivos – se possível, até indefinidamente – sem interferir na viabilidade das plantas regeneradas (CID, 2014). Esse objetivo é alcançado mediante alteração das condições físicas e químicas da micropropagação. As alterações químicas se referem aos constituintes dos meios de cultivo. Nesse caso, são adicionados osmorreguladores nos meios de cultura, geralmente manitol, sorbitol ou sacarose, reguladores de crescimento, ou diminuídos e até suprimidos alguns constituintes orgânicos e inorgânicos. A aplicação de ABA tem sido relatada como alternativa para a redução do metabolismo no crescimento mínimo, promovendo uma melhoria na conservação *in vitro* (RAI et al., 2011). As alterações físicas consistem na redução da temperatura de cultivo, alteração do tipo de vedação dos frascos de cultivo e da intensidade e duração do fotoperíodo (ROCA; ARIAS; CHAVÉZ, 1991).

Alguns exemplos de espécies que já foram conservadas no sistema de crescimento mínimo incluem palmeiras em geral, tamareira (*Phoenix dactilyfera*), coco (*Cocos nucifera*), oliveira (*Olea europaea*), bananeira (*Musa* sp.), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), abacaxi (*Ananas comosus*), maracujazeiro (*Passiflora giberti*) e açaí (*Euterpe oleracea*) (CANTO et al., 2004; LEMOS et al., 2002; OLIVEIRA; MAUÉS; KALUME, 2001; FARIA et al., 2006; INIBAP, 2006; LAMBARDI et al., 2002; LEDO et al., 2007). Apesar de haver tantas espécies com resultados promissores nesse sistema, não se pode utilizar um protocolo padrão para todas as plantas, pois cada espécie apresenta uma resposta diferente de acordo com suas peculiaridades.

A criopreservação consiste em conservar o material biológico sob condições de temperaturas ultrabaixas, em nitrogênio líquido (-196°C) ou em sua fase de vapor (-150°C). As baixas temperaturas reduzem o metabolismo celular e praticamente paralisam a deterioração biológica e as alterações genéticas, contribuindo para a estabilidade do material preservado (KARTHA, 1985). Um protocolo de criopreservação apresenta as etapas de pré-crescimento, crioproteção, armazenamento (Figura 5), descongelamento e regeneração. O principal desafio de congelar e descongelar é evitar que a água forme cristais de gelo, pois eles provocam a ruptura do sistema de membranas celulares, levando à perda da permeabilidade seletiva de membranas e da compartimentação celular, causando colapso e morte celular (KARLSSON, 2001). Para evitar isso, são utilizadas substâncias crioprotetoras.

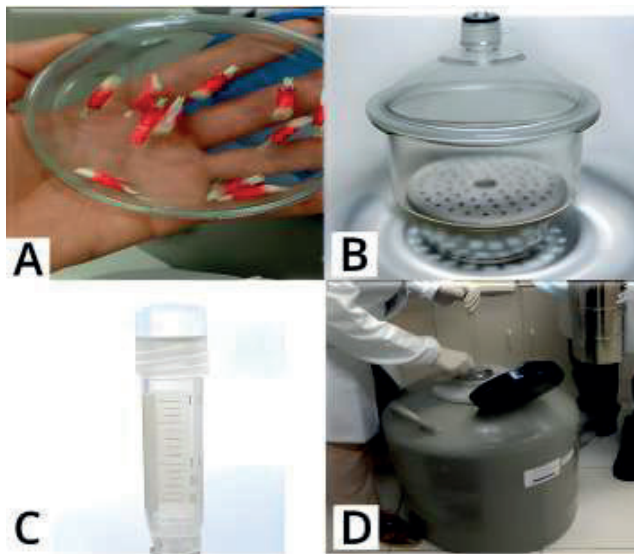


Figura 5: Criopreservação de grãos de pólen. No quadrante “A”, escolha do material; no “B”, dessecação por 3 a 6 horas; no “C”, armazenamento do material em criotubo; e no “D”, imersão em nitrogênio líquido para congelamento rápido

Fonte: fotos tiradas por Livia Cristina da Silva no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da UFG em 2018.

Se comparada aos métodos convencionais de armazenamento, a criopreservação apresenta vantagens, como a demanda de pequeno volume de material, redução do espaço e custos associados à manutenção de coleções *in vivo* e simplificação dos procedimentos de transporte. Também reduz a quantidade de subcultivos e as possibilidades de variações somaclonais (PRUDENTE et al., 2019). Espécies com sementes recalcitrantes, intermediárias ou aquelas que se propagam vegetativamente têm a criopreservação como possibilidade de conservação.

Uma alternativa à criopreservação é o desenvolvimento de sementes sintéticas, processo em que explantes sensíveis ao

processo convencional de criopreservação, como meristemas e embriões somáticos, são encapsulados em um material apropriado, como o alginato de prata (Figura 6). O uso do ABA durante o cultivo *in vitro* dos explantes pode ser indicado em algumas espécies para a indução da embriogênese somática e da entrada dos embriões em um estado quiescente, melhorando, inclusive, o *status* de tolerância à dessecação do embrião. É, portanto, uma possibilidade a ser considerada no desenvolvimento de protocolos para produção de sementes sintéticas de algumas espécies (RAI et al., 2011).

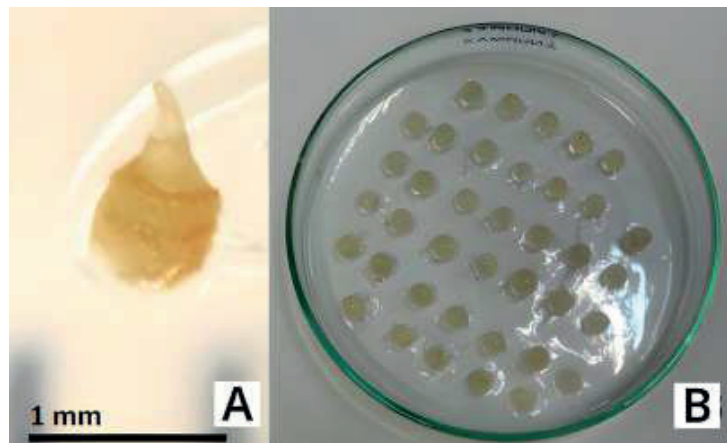


Figura 6: Semente sintética. Na porção “A”, meristema de abacaxi. Na “B”, encapsulamento do meristema

Fonte: Fotos tiradas por Livia C. da Silva. Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da UFG (2018).

Considerações finais

A cultura de tecidos vegetais é uma importante ferramenta biotecnológica para a conservação de recursos genéticos vegetais, uma vez que permite a micropropagação de espécies cujo período juvenil seja muito prolongado para a obtenção de sementes.

A aplicação da cultura de tecidos vegetais requer estudos particulares para cada espécie nova com a qual se deseja estabelecer um protocolo de micropropagação, além de estrutura laboratorial adequada e recurso humano qualificado, uma vez que o domínio dos protocolos relacionados à regeneração de plantas *in vitro* requer certo nível de conhecimento acerca da fisiologia de plantas e de técnicas de assepsia microbiológicas. Ainda assim, ela possibilita desdobramentos tecnológicos que vão além da conservação *in vitro*, como a limpeza de clones infectados por agentes virais, fúngicos e bacterianos, o estudo da produção de metabólitos secundários de plantas para a triagem de novas biomoléculas com interesse cosmético e medicinal e melhoramento genético convencional ou por meio da transformação genética de plantas. Outra finalidade da cultura de tecidos é a coleção de germoplasmas vegetais mantidos sob condições de crescimento mínimo, sendo uma estratégia importante para a conservação de espécies ameaçadas de extinção devido à perda ou fragmentação de hábitat, ou, ainda, devido às mudanças climáticas.

REFERÊNCIAS

- BAIRU, Michael W.; AREMU, Adeyemi O.; VAN STADEN, Johannes. Somaclonal variation in plants: Causes and detection methods. **Plant Growth Regulation**, v. 63, p. 147-173, dez. 2010.
- CANTO, Ana Maria M. E. *et al.* Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 7, p. 717-720, jul. 2004.
- CID, L. Pedro Barrueto. **Hormônios vegetais em plantas superiores**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005.
- CID, L. Pedro Barrueto. **Cultivo in vitro de plantas**. 3. ed. Brasília, DF: Embrapa 2014.
- LEMONS, Eurico E. P. de *et al.* Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesqu Agropec Bras**, v. 37, n. 10, p. 717-720, out. 2002.
- DONG, Hao-Di.; ZHONG, Jian-Jiang. Significant improvement of taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* by combining elicitation with sucrose feed. **Biochem Eng J**, v. 8, n. 2, p. 145-150, set. 2001.
- FAQUIN, Valdemar. **Nutrição Mineral de Plantas**. 1. ed. Lavras: UFLA/FAEPE, 2005.
- FARIA, Gláucia A. *et al.* Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 267-270, ago. 2006.
- FLORES, Rejane *et al.* Sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (Amaranthaceae). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 3, p. 192-199, ago. 2013.
- GENOUD, C. *et al.* Effects of micropropagation conditions of rose shootlets on chlorophyll fluorescence. **Photosynthetica**, v. 36, p. 243-251, jun. 1999.

- GEORGE, Edwin F. **Plant propagation by tissue culture:** In Practice. 2. ed. Edington: Exegetics Limited, 1996.
- GRATTAPAGLIA, Dario; MACHADO, Marcos Antônio. Micropropagação. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. *In:* TORRES, Antônio Carlos; CALDAS, Linda Styer; BUSO, José Amauri Buso (org.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** 1. ed. Brasília: Embrapa, 1998, p. 183-260.
- GUERRA, Miguel Pedro *et al.* **Biotechnologia I.** Santa Catarina: LFDGV/UFSC, 2016. (Apostila).
- HABERLANDT, Gottlieb. Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *In:* LAIMER, M.; RÜCKER, Waltraud (org.). **Plant Tissue Culture.** Viena: Springer, 2003, p. 69-92.
- HOFFMANN, Alexandre. Aclimação de mudas produzidas *in vitro* e *in vivo*. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 23, n. 216, p. 21-24, 2002. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/200022/1/7190-2002-p.21-24.pdf>. Acesso em: 25 ago. 2022.
- INIBAP. **Global Conservation Strategy for *Musa* (Banana and Plantain).** Montpellier, FR: ProMusa, 2006.
- JUNGHANS, Tatiana G.; SOUZA, Antônio S. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas.** 1. ed. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009.
- KAEPLER, Shawn M.; RHEE, Yong; KAEPLER, Heidi F. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. **Plant molecular biology**, v. 4, n. 2-3, p. 179-188, jun. 2000.
- KARLSSON, Jens O. M. A theoretical model of intracellular devitrification. **Cryobiology**, v. 42, n. 3, p. 154-169, maio 2001.
- KARTHA, Krishnan K. Meristem culture and germplasm preservation. *In:* KARTHA, Krishnan K. (org.). **Cryopresevation of plant cells and organs.** Boca Raton: CRS Press, 1985, p. 115-134.

- KEVERS, Claire *et al.* Hyperhydricity of micropropagated shoots: A typically stress-induced change of physiological state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 77, p. 181-191, maio 2004.
- KITIMU, Shedrack R. *et al.* Meristem micropropagation of cassava (*Manihot esculenta*) evokes genome-wide changes in DNA methylation. **Frontiers in plant science**, v. 6, n. 36, p. 3778, ago. 2015.
- LAMBARDI, Maurizio *et al.* Medium and long-term *in vitro* conservation of olive germplasm (*Olea europaea* L.). **Acta Horticulturae**, v. 586, p. 109-112, out. 2002.
- LÉDO, Ana S. *et al.* Efeito da sacarose e do manitol na conservação *in vitro* por crescimento lento de coqueiro anão. **Magistra**, Cruz das Almas, BA, v. 19, n. 4, p. 346-351, out./dez. 2007.
- MALAVOLTA, Eurípedes. **Manual de nutrição mineral de plantas**. 1. ed. Ouro Fino, MG: Agronomica Ceres, 2006.
- MATSUMOTO, Kazumitsu; CARDOSO, Luciene D.; SANTOS, Izulmé Rita I. **Manual de curadores de germoplasma vegetal: conservação *in vitro***. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/149791/1/doc318.pdf>. Acesso em: 25 ago. 2022.
- MURASHIGE, Toshio. Plant Propagation Through Tissue Cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 25, p. 135-166, jun. 1974.
- OLIVEIRA, Maria do S. P. de; MAUÉS, Márcia M.; KALUME, Maura A. de A. Viabilidade de pólen *in vivo* e *in vitro* em genótipos de açaizeiro. **Acta Botanica Brasilica**, v. 15, n. 1, p. 27-33, 2001.
- PAIVA, Renato; PAIVA, Patrícia Duarte de O. Cultura de Tecidos Vegetais. *In*: PAIVA, Renato; PAIVA, Patrícia Duarte de O. **Cultura de Tecidos**. Lavras, MG: FAEPE/UFLA, 2001a, p. 7-8.
- PAIVA, Renato; PAIVA, Patricia Duarte de O. **Cultura de Tecidos Vegetais**. Lavras, MG: FAEPE/UFLA, 2001b.

- PRADO, Maria J. *et al.* Detection of somaclonal variants in somatic embryogenesis-regenerated plants of *Vitis vinifera* by flow cytometry and microsatellite markers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 103, p. 49-59, maio 2010.
- PRUDENTE, Débora de O. *et al.* The cryoprotectant PVS2 plays a crucial role in germinating *Passiflora ligularis* embryos after cryopreservation by influencing the mobilization of lipids and the antioxidant metabolism. **J Plant Physiol**, v. 239, p. 71-82, jun. 2019.
- RAI, Manoj K. *et al.* The role of abscisic acid in plant tissue culture: A review of recent progress. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 106, p. 179-190, jan. 2011.
- RAVEN, Peter H.; EVERT, Ray F.; EICHHORN, Susan E. **Biologia Vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.
- RIBEIRO, Ana P. **Micropropagação, avaliação da variação somaclonal e detecção de vírus em videira**. 2012. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras, 2012.
- ROCA, William M.; ARIAS, Doama I.; CHÁVEZ, R. Métodos de conservación *in vitro* del germoplasma. *In*: ROCA, William M.; MROGINSKI, Luis A. (org.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali, Colômbia: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991, p. 697-712.
- SALDANHA, Cleber W. *et al.* A CO₂-enriched atmosphere improves *in vitro* growth of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 49, n. 4, p. 433-444, maio 2013.
- SANTOS, Breno Régis *et al.* Problemas no cultivo *in vitro*. Cultura de tecidos. *In*: PAIVA, Renato; PAIVA, Patrícia Duarte de O. **Cultura de Tecidos**. Lavras: MG: FAEPE/UFLA, 2001, p. 73-79.
- SARASAN, Viswambharan *et al.* Conservation *in vitro* of threatened plants - Progress in the past decade. **In Vitro Cell Dev Biol Plant**, v. 42, n. 3, p. 206-214, maio 2006.

- SILVEIRA, Andreia A. da C.; LOPES, Francis J. F.; SIBOV, Sérgio T. Micropropagation of *Bambusa oldhamii* Munro in heterotrophic, mixotrophic and photomixotrophic systems. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 141, n. 2, p. 315-326, fev. 2020.
- SMULDERS, Marinus J. M.; DE KLERK, Geert-Jan. Epigenetics in plant tissue culture. **Plant Growth Regul**, v. 63, n. 2, p. 137-146, mar. 2011.
- SOUZA, Julio C. DE.; RESCAROLLI, Cristiane L. de S.; NUNEZ, Cecília V. Produção de metabólitos secundários por meio da cultura de tecidos vegetais. **Revista Fitos**, v. 12, n. 3, p. 269-280, out. 2018.
- SOUZA, Wagner R. de. **Estudo do efeito elicitor do ácido salicílico e do polissacarídeo extraído de sementes de paineira (*Chorisia speciosa*) em cultura de células de amora preta (*Rubus fruticosus*)**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.
- STELPFLUG, Scott *et al.* Consistent and Heritable Alterations of DNA Methylation Are Induced by Tissue Culture in Maize. **Genetics**, v. 198, n. 1, p. 209-218, set. 2014.
- TAIZ, Lincoln *et al.* **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. Tradução de Alexandra A. Mastroberti 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- TORRES, Antônio C.; CALDAS, Linda S.; BUZZO, José. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa, 1998.
- TRICKER, Penny J. *et al.* Low relative humidity triggers RNA-directed de novo DNA methylation and suppression of genes controlling stomatal development. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 10, p. 3799-3813, mar. 2012.
- VERPOORTE, Robert; MARASCHI, Marcelo. Engenharia do metabolismo de plantas medicinais. *In*: YUNES, Rosendo A.; CALIXTO, João B. (org.). **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna: métodos de estudo, fitoterápicos e fitofármacos, biotecnologia, patente**. Chapecó, SC: Argos; UNOESC, 2001, p. 381-432.

WARAICH, Ejaz A. *et al.* Improving agricultural water use efficiency by nutrient management in crop plants. **Acta Agriculturae Scandinavica Section B: Soil and Plant Science**, v. 61, n. 4, p. 291-304, mar. 2011.

ZAKRZEWSKI, Falk *et al.* DNA methylation of retrotransposons, DNA transposons and genes in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). **The Plant Journal**, v. 90, n. 6, p. 1156-1175, jun. 2017.