

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Documentos

ISSN 0103 - 0205
Dezembro, 2006

157

**Curso de Cultivo de
Tecidos Vegetais**



Embrapa

República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Luís Carlos Guedes Pinto
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Luis Carlos Guedes Pinto
Presidente

Silvio Crestana
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires

Hélio Tollini

Ernesto Paterniani

Cláudia Assunção dos Santos Viegas

Membros

Diretoria Executiva da Embrapa

Silvio Crestana
Diretor-Presidente

Tatiana Deane de Abreu Sá

José Geraldo Eugênio de França

Kepler Euclides Filho

Diretores Executivos

Embrapa Algodão

Robério Ferreira dos Santos
Chefe Geral

Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão
Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Auxiliadora Lemos Barros
Chefe Adjunto de Administração

José Renato Cortez Bezerra
Chefe Adjunto de Comunicação e Negócios



ISSN 0103-0205
Dezembro, 2006

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Algodão

Documentos 157

Curso de Cultivos de Tecidos Vegetais

Julita Maria Frota Chagas Carvalho
Renato Wagner da Costa Rocha

Campina Grande, PB.
2006

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Algodão

Rua Osvaldo Cruz, 1143 – Centenário
Caixa Postal 174
CEP 58107-720 - Campina Grande, PB
Telefone: (83) 3315-4300
Fax: (83) 3315-4367
algodao@cnpa.embrapa.br
http://www.cnpa.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão

Secretária: Nívia Marta Soares Gomes

Membros: Cristina Schetino Bastos

Fábio Akiyoshi Suinaga

Francisco das Chagas Vidal Neto

Luiz Paulo de Carvalho

José Américo Bordini do Amaral

José Wellington dos Santos

Nair Helena Castro Arriel

Nelson Dias Suassuna

Supervisor Editorial: Nívia Marta Soares Gomes

Revisão de Texto: Julita Maria Frota Chagas Carvalho

Tratamento das Ilustrações: Geraldo Fernandes de Sousa Filho

Capa: Flávio Tôrres de Moura/Maurício José Rivero Wanderley

Editoração Eletrônica: Geraldo Fernandes de Sousa Filho

1ª Edição

1ª impressão (2006) 1.000 exemplares

Todos os direitos reservados

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

EMBRAPA ALGODÃO (Campina Grande, PB)

Curso de Cultivos de Tecidos Vegetais, por Julita Maria Frota Chagas Carvalho e Renato Wagner da Costa Rocha. Campina Grande, 2006.

23p. (Embrapa Algodão. Documentos, 157)

1. Cultura de Tecido Vegetais. I. Carvalho, J.M.F.C. II. Rocha, R.W. da C. Pimentel, N.W. III. Título. VI. Série.

CDD575.1

© Embrapa 2006

Autores

Julita Maria Frota Chagas Carvalho

Eng. Agr., DSc., Embrapa Algodão Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenário
CEP 58107-720, Campina Grande, PB.

E-mail: julita@cnpa.embrapa.br

Renato Wagner da Costa Rocha

Assistente da Embrapa Algodão

E-mail: rwagner@cnpa.embrapa.br

Apresentação

Grandes avanços tem sido obtidos na agricultura pelo melhoramento genético de plantas, recentemente incrementado com o emprego da biotecnologia vegetal, por meio de técnicas de biologia molecular e cultura de células de tecidos.

No objetivo deste documento foram ministradas noções teóricas sobre as técnicas de cultivo de tecidos vegetais e sua aplicação no melhoramento de plantas.

Robério Ferreira dos Santos
Chefe Geral da Embrapa Algodão

Sumário

Curso de Cultivos de Tecidos Vegetais	11
Introdução	11
Programação	12
Resumo das Aulas Ministradas.....	14
Histórico do Cultivo de Tecidos Vegetais.....	14
Conceitos Básicos de Cultura de Tecidos Vegetais.....	16
Organização de Um Laboratório de Cultura de Tecidos	18
Segurança de um Laboratório de Cultura de Tecidos	19
Fatores que Influem no Êxito do Cultivo de Tecidos.....	20
Aplicação do Cultivo de Tecidos no Melhoramento de Plantas.....	21
Transferência das Plantas a Condições <i>Ex Vitro</i> Aclimatização	22
Considerações gerais.....	23
Referências Bibliográficas	23

Curso de Cultivos de Tecidos Vegetais

Julita Maria Frota Chagas Carvalho
Renato Wagner da Costa Rocha

Introdução

No ano de 2006, o Curso de Cultivo de Tecidos, em sua terceira edição, teve lugar na cidade de Campina Grande, PB.

O evento visou à capacitação de estudantes de graduação e pós-graduação em Agronomia, Biologia, Ciência Florestais e áreas correlatas, das Universidades locais, que atuarão futuramente no segmento biotecnológico, seja do ensino seja da pesquisa.

O evento foi composto de palestras que pretendiam divulgar a importância das técnicas de cultivo de tecidos no melhoramento e na engenharia genética.

Os assuntos que foram abordados foram histórico e conceitos básicos de cultura de tecidos vegetais, apresentação de vídeos, organização e segurança de um laboratório de cultura de tecidos, fatores que influem no êxito do cultivo de tecidos e sua aplicação no melhoramento, visita ao laboratório e transferência de plantas a condições *ex vitro*.

As aulas foram ministradas para duas turmas, uma das 7h30 às 11h30 e outra das 13h30 às 17h30.

Programação

04/12/06 – Segunda-feira

1a. Turma:

7h30 – 8h00: Recepção e entrega de material

8h00 – 9h30: Aula - **Histórico do cultivo de tecidos vegetais**

9h30 – 10h00: Intervalo para o café

10h00 – 11h00: Aula - **Conceitos básicos de cultura de tecidos vegetais**

11h00 – 11h30: Apresentação do vídeo institucional

2a. Turma:

13h30 – 14h00: Recepção e entrega de material

14h00 – 15h30: Aula - **Histórico do cultivo de tecidos vegetais**

15h30 – 16h00: Intervalo para o café

16h00 – 17h00: Aula - **Conceitos básicos de cultura de tecidos vegetais**

17h00 – 17h30: Apresentação do vídeo institucional

05/12/06 – Terça-feira

1a. Turma:

7h30 – 9h00: Aula - **Organização de um laboratório de cultura de tecidos**

9h00 – 9h30: Intervalo para o café

9h30 – 11h30: Aula - **Segurança de um laboratório de cultura de tecidos**

2a. Turma:

13h30 – 15h00: Aula - **Organização de um laboratório de cultura de tecidos**

15h00 – 15h30: Intervalo para o café

15h30 – 17h30: Aula - **Segurança de um laboratório de cultura de tecidos**

06/12/06 – Quarta-feira

1a. Turma:

7h30 – 9h30: Aula - **Fatores que influem no êxito do cultivo de tecidos**

9h30 – 10h00: Intervalo para o café

10h00 – 11h30: Aula - **Aplicação do cultivo de tecidos no melhoramento de plantas**

2a. Turma:

13h30 – 15h30: Aula - **Fatores que influem no êxito do cultivo de tecidos**

15h30 – 16h00: Intervalo para o café

16h00 – 17h30: Aula - **Aplicação do cultivo de tecidos no melhoramento de plantas**

07/12/06 – Quinta-feira

1a. Turma:

7h30 – 9h30: Aula - **Visita ao Laboratório de cultivo de tecidos**

9h30 – 10h00: Intervalo para o café

10h00 – 10h30: Aula: **Transferên cia das plantas a condições *ex vitro***

10h30 – 11h00 – Apresentação do vídeo Práticas de Laboratório

11h00 – 11h30 - Encerramento

2a. Turma:

13h30 – 15h30: Visita ao Laboratório de cultivo de tecidos

15h30 – 16h00: Intervalo para o café

16h00 – 16h30: Aula: **Transferên cia das plantas a condições *ex vitro***

16h30 – 17h00 – Apresentação do vídeo Práticas de Laboratório

17h00 – 17h30 - Encerramento

Resumo das Aulas Ministradas

Histórico do Cultivo de Tecidos Vegetais

Julita Maria Frota Chagas Carvalho
Pesquisadora da Embrapa Algodão
E-mail:julita@cnpa.embrapa.br

A cultura de tecidos vegetais é uma técnica de surgimento recente, pois os primeiros passos foram dados já no início do século XX. Entre os pioneiros nos cultivos *in vitro*, citados por Pasqual et al. (1997), destacamos Hanning (1904), que foi o primeiro a cultivar embriões imaturos de crucíferas *in vitro* com sucesso; Van Overbeck e colaboradores (1941), que promoveram a diferenciação e o crescimento de calo a partir de embriões zigótico de *Datura stramonium* pela inclusão de leite de coco no meio de cultura; Ball (1946), que regenerou plantas de *Lupinus* e *Tropaeolum* a partir de ápices caulinares.

Os maiores avanços foram notados a partir da segunda metade do século XX.

A partir da descoberta dos hormônios auxina e citocinina, houve grande avanço no estudo da cultura de tecidos vegetais. Skoog e Miller (1957) demonstraram a razão auxina/citocinina e sua importância na emissão de raízes ou brotação.

Em 1960, Cocking fez o primeiro isolamento de protoplastos a partir de material *in vitro*.

Em 1965, Aghion-Prat induziu a floração *in vitro* em tecido de fumo.

Zaenen e colaboradores (1975) descobriram que o plasmídeo Ti é o principal indutor de tumores de *Agrobacterium* – uma bactéria de grande importância na transformação genética em protoplastos vegetais.

Os primeiros passos da engenharia genética em plantas foram caracterizados pela demonstração da integração do DNA plasmidial em células de fumo (CHILTON et al., 1977).

Em 1985, Horsch e colaboradores obtiveram a infecção e a transformação genética em discos foliares com *Agrobacterium*, bem como a regeneração das plantas transformadas.

De 1985 a 2000, houve grandes avanços no estabelecimento de protocolos de regeneração *in vitro* de células ou tecidos transformados de muitas espécies, inclusive de algodão.

Conceitos Básicos de Cultura de Tecidos Vegetais

Julita Maria Frota Chagas Carvalho
Pesquisadora da Embrapa Algodão
E-mail: julita@cnpa.embrapa.br

A cultura de tecidos, como qualquer outra área do conhecimento, apresenta uma grande quantidade de termos e conceitos básicos, os quais devem ser bem conhecidos por quem trabalha ou deseja trabalhar na área. A seguir destacamos alguns conceitos e uso mais frequente na cultura de tecidos vegetais, dentre os ministrados no curso:

Auxinas – Reguladores de crescimento vegetal que causam alongamento celular, dominância apical, enraizamento e outros fenômenos.

Biotecnologia – É a intervenção do homem no desenvolvimento de métodos e assim criar novas formas de vida que por meio da natureza seria impossível surgir.

Calo – Aglomerado de células não organizadas, irregularmente diferenciadas, que se multiplicam desordenadamente e se desenvolvem a partir de tecidos vegetais normalmente em resposta a injúria física ou química.

Citocinina – Regulador de crescimento vegetal que causa divisão celular, diferenciação celular e de brotos, quebra de dormência apical e outros fenômenos.

Clonagem – Ato de se obter novas culturas através de subcultivos, ou de se inserir um gene específico ou uma seqüência de DNA em uma molécula vetora.

Diferenciação – Série de modificações relativamente permanentes e irreversíveis que ocorrem em células meristemáticas e resultam em

distinções entre os tipos de células de um organismo.

Embriogênese – Processo de iniciação e desenvolvimento de um embrião, que pode ser sexual (embrião zigótico, embriogênese propriamente dita) ou assexual (embrião somático, embriogênese somática).

Embrióides – Estrutura semelhante ao embrião zigótico, porém, originária de uma célula somática.

Explante – Segmento de tecidos ou órgão vegetal usado para iniciar um cultura *in vitro*

Gene marcador – Gene que expressa características bem notórias e que permite estabelecer a sua presença no genoma e facilita a detecção de eventos de recombinação.

Indução – Remoção do agente de repressão permitindo a iniciação de um processo

In vitro – Referente a fenômenos que ocorre em vidro, sob condições de laboratório, em meio de cultura e em condições assépticas.

Micropropagação – Propagação *in vitro*, propagação vegetativa ou cultura de tecido propriamente dita

Protoplasto – Célula desprovida de parede celular

Somaclone – Propagação clonal de células somáticas

Subcultura – Ato de transferir uma porção de cultura para um novo meio

Totipotência – Capacidade de células individuais expressarem o fenótipo da planta completa da qual foram derivadas.

Zigoto – Células diplóides resultantes da fusão de gametas.

Organização de Um Laboratório de Cultura de Tecidos

Julita Maria Frota Chagas Carvalho
Pesquisadora da Embrapa Algodão
E-mail:julita@cnpa.embrapa.br

Nesta aula foram abordados os requisitos necessários à organização de um laboratório de cultivo de tecidos.

Um laboratório de culturas de tecidos não deve ser localizado em ambiente sujeito a poeira e a corrente de ventos ou próximo a fontes potenciais de microorganismo ou de contaminação química (CARVALHO, 2002).

Sua montagem e organização dependem dos objetivos a que se propõe. Um laboratório de pesquisa como o da Embrapa Algodão pode ser pequeno, porém deve ser muito especializado.

As dependências do laboratório devem estar no mesmo nível, de fácil acesso, uma vez que as atividades típicas de cultura de tecidos requer uma movimentação freqüente entre as diferentes áreas. Dessa forma, a distribuição das dependências do laboratório deve ser funcional, facilitando o deslocamento de pessoal e materiais.

As salas de preparação de meio, transferência e de crescimento, bem como câmaras frias devem ser isoladas e com circulação controlada, principalmente de pessoas estranhas ao serviço. A localização de salas e o espaço disponível dependerão da natureza do trabalho e preferência pessoal. Os tipos de sal e seus tamanhos estarão em função da operação e do tipo de planta a ser propagada.

Em regiões onde ocorrem frequentes quedas de energia elétrica, é recomendável que se tenha um gerador de energia para fornecer eletricidade em uma emergência, principalmente considerando o controle de temperatura nas salas de crescimento, câmaras frias e iluminação.

Segurança de um Laboratório de Cultura de Tecidos

Julita Maria Frota Chagas Carvalho
Pesquisadora da Embrapa Algodão
E-mail: julita@cnpa.embrapa.br

Segundo a Declaração dos Direitos Humanos, todo homem tem direito à vida. É preciso que nos preocupemos com a nossa segurança no ambiente de trabalho e, quando se trabalha em um laboratório, é preciso que se conheçam os riscos a que se está exposto e como melhorar suas condições de segurança (<http://www.unb.br>).

Para conscientizar os participante do curso sobre os riscos que se correm nos laboratórios, abordaram-se vários tópicos, dos quais, são arrolados os seguintes: 1) Por que os acidentes acontecem?, 2) Tipos de acidentes, 3) Segurança nos laboratórios, 4) Segurança de ordem pessoal, 5) Segurança referente ao laboratório, 6) Uso de materiais de vidro, 7) Uso de chamas, 8) Uso de capelas, 9) Uso de equipamentos elétricos, 10) Uso de estufas.

Fatores que Influem no Êxito do Cultivo de Tecidos

Julita Maria Frota Chagas Carvalho
Pesquisadora da Embrapa Algodão
E-mail: julita@cnpa.embrapa.br

Cultivo de tecido vegetal consiste no crescimento e multiplicação de células, tecidos, órgãos ou parte de órgãos de uma sobre um meio nutritivo e em condições assépticas.

O cultivo *in vitro* baseia-se principalmente no aproveitamento da totipotência das células vegetais, ou seja, na capacidade da célula produzir órgãos como brotos e/ou raízes, embriões somáticos, que regeneram uma planta completa num meio de cultivo favorável.

Os cultivos de tecido podem iniciar de qualquer parte da planta: gemas, raízes, folhas, diferentes tecidos, células isoladas, protoplastos, sementes, embriões zigóticos, anteras e pólen etc. A escolha de um ou de outro explante dependerá dos objetivos desejados, da disponibilidade do material vegetal e da capacidade de resposta do material.

Qualquer técnica de cultivo *in vitro* tem como fim primário dirigir o crescimento e o desenvolvimento do explante manipulado em seu redor. Este controle se exerce mediante a adição ao meio de cultivo de substâncias de diversas naturezas, tais como: reguladores de crescimento, concentração de determinados nutrientes e condição de iluminação e temperatura

Os fatores que influem no êxito do cultivo de culturas de tecidos são:

- origem e tipo do material vegetal – talvez o fator mais importante,
- composição do meio de cultivo,
- assepsia do laboratório,
- treinamento do operador,
- condições de incubação.

Aplicação do Cultivo de Tecidos no Melhoramento de Plantas

Julita Maria Frota Chagas Carvalho
Pesquisadora da Embrapa Algodão
E-mail:julita@cnpa.embrapa.br

Várias são as aplicações das técnicas de cultivo de tecidos, a começar pela clonagem, seu lado mais visível, seguida pela cultura de células (suspensões celulares em meio líquido), tecidos e órgãos para fins práticos, produção de metabólitos secundários em biorreatores, geração de variantes somaclonais, microenxertia, tecnologia dos protoplastos, etc.

Um dos esteios básicos da chamada biologia molecular de plantas (engenharia genética) depende, em grande extensão, de estratégias e técnicas utilizadas em biologia celular.

Entre as muitas técnicas de cultivo de tecidos vegetais utilizadas para acalerar os programas de melhoramento genético de plantas, citamos:

- conservação e avaliação germoplasma,
- multiplicação de genótipo,
- variabilidade genética,
- introgressão genética,
- hibridação somática a partir da fusão de protoplastos,
- obtenção de plantas haplóides a partir da cultura de anteras,
- obtenção de plantas livres de vírus
- micropropagação.

Transferência das Plantas a Condições *Ex Vitro* Aclimatização

Julita Maria Frota Chagas
Carvalho
Pesquisadora da Embrapa Algodão
E-mail: julita@cnpa.embrapa.br

A aclimatização ou aclimatação é um dos processos indispensáveis para a obtenção de uma planta propagada por meio de biotecnologia. Consiste num conjunto de técnicas que visam adaptar as plantas a um meio ambiente muito diferente daquele onde ele foi formada, delimitado por um tipo especial de recipiente, sendo mais comumente usado o tubo de ensaio.

Dentro deste recipiente, são criadas condições ambientais peculiares no que se refere ao substrato composto de ar, água e luminosidade, entre outros. Vários estudos e pesquisas têm sido realizados no sentido de amenizar o impacto sofrido pela planta no momento da transferência do laboratório para o local definitivo, o solo.

Considerações gerais

O cultivo de tecidos é uma ferramenta importante para auxiliar o melhoramento e a engenharia genética.

Grande avanço tem sido obtido na agricultura pelo melhoramento genético de plantas, recentemente incrementado com o emprego da biologia vegetal.

Este curso propôs-se a ministrar noções teóricas sobre as técnicas de cultivo de tecidos vegetais e seu emprego no melhoramento de plantas.

Referências Bibliográficas

CARVALHO, J.M.C.F. **Procedimentos para a implantação de um laboratório de cultivo de tecido**. Campina Grande: EMBRAPA – CNPA, 2002. 8p. (EMBRAPA-CNPA. Circular Técnica, 65)

MANUAL DE SEGURANÇA EM LABORATÓRIO. Disponível em <http://www.unb.br>. Acesso em: 18 de out. de /2006

PASQUAL, M.; HJOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações - introdução : fundamentos básicos**. Lavras : UFLAFAPAE, 1997. 159p.



**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**

