

CAPÍTULO 13

Uso e Aplicações Biotecnológicas do Cultivo in Vitro de Células, Tecidos e Órgãos de Plantas

*Jonny Everson Scherwinski-Pereira
Frederico Henrique da Silva Costa
Rodrigo Silva Guedes*

1. Biotecnologia: Conceitos, Marcos Históricos e Aplicações

O termo biotecnologia foi inicialmente utilizado pelo húngaro Karl Ereky em 1919 para se referir a “todas as linhas de trabalho, cujos produtos eram produzidos a partir de matéria bruta com o auxílio de organismos vivos”. No entanto, atualmente existem dois modos de se definir biotecnologia: um mais amplo e outro mais restrito. Num sentido mais amplo, biotecnologia se refere a qualquer técnica que utilize organismos vivos (ou parte deles) para produzir ou modificar produtos, melhorar plantas e animais geneticamente ou desenvolver microrganismos para usos específicos. Neste sentido, sua utilização vem desde os primórdios da humanidade, a partir do momento em que o homem começou a domesticar animais e plantas e usá-los para diversos fins.

De maneira mais restrita, o termo biotecnologia pode ser conceituado como um conjunto de técnicas advindas da bioquímica e biologia molecular que podem trazer benefícios aos seres humanos. Assim, foi a partir da década de 70 que ocorreram os grandes avanços na área de biologia molecular, com a manipulação e transferência de informação genética entre seres vivos de espécies diferentes por meio de vias não sexuais, o que culminou no desenvolvimento de organismos geneticamente modificados (OGMs) (PEREIRA et al., 2004).

Há milhares de anos tem sido evidenciado o uso de processos biotecnológicos para a produção de bens e serviços. Isso é mais evidente na produção de alimentos, como vinho, cerveja e pão, por meio de fermentações microbianas. Nos últimos tempos, diversos acontecimentos marcaram a biotecnologia, alguns dos quais são resumidamente apresentados na Tabela 1. Além desses, outros eventos ajudaram a consolidar a biotecnologia moderna. Atualmente, o ritmo de desenvolvimento da área é crescente, mantendo,

inclusive, uma acentuada interação com diversos outros setores da ciência e tecnologia tais como: biologia molecular, fisiologia, microbiologia e engenharia química e ambiental.

Tabela 1. Eventos que marcaram a história da biotecnologia.

Área	Responsável	Ano	Aplicação
Biologia celular	Robert Hooke	1665	Observação microscópica da estrutura da cortiça, evidenciando que tecidos são constituídos por células
Biologia celular	Anton van Leeuwenhoek	1676–1783	Observação e descrição de seres microscópicos unicelulares, como protozoários e bactérias, incluindo espermatozoides
Genética	Gregor Mendel	1865	Formula e apresenta em dois encontros da Sociedade de História Natural de Brno as leis da hereditariedade, hoje chamadas Leis de Mendel
Microbiologia	Louis Pasteur	1864	Cria o processo que leva o seu nome, conhecido atualmente como pasteurização, usado para destruir microrganismos patogênicos em produtos comestíveis
Microbiologia	Robert Koch	1882	Anuncia a descoberta da bactéria responsável pela tuberculose (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>) e sua responsabilização etiológica
Microbiologia	Ronald Ross	1896	Descoberta do protozoário <i>Plasmodium</i> , causador da malária em humanos
Genética	Thomas Hunt Morgan	1907	Demonstração do papel dos cromossomos na hereditariedade; formulação da teoria da mutação e das bases hereditárias
Microbiologia	Carlos Chagas	1909	Identificação do agente causal da doença de Chagas, o protozoário <i>Trypanosoma cruzi</i>
Genética	Hermann Muller	1926	Descoberta de que os raios X poderiam induzir mutações
Genética	Thomas Hunt Morgan	1910	Demonstração de que os genes estão localizados nos cromossomos
Microbiologia	Alexander Fleming	1928	Descoberta da penicilina
Genética	James Watson e Francis Crick	1953	Preposição do modelo que explicava a estrutura da molécula de DNA
Genética	Matthew Meselson e Frank Stahl	1957	Demonstração do mecanismo de replicação do DNA
Genética	Har Khorana, Robert Holley e Marshall Nirenberg	1967	Decifram o mecanismo que permite ao DNA ser traduzido em proteínas
Genética	Paul Berg	1972	Emprego das enzimas de restrição e ligase para produção de uma molécula de DNA híbrido. Realização dos primeiros experimentos sobre clonagem de DNA

Continua...

Tabela 1. Continuação.

Genética	Stanley Cohen e Herbert Boyer	1973	Primeira experiência de engenharia genética aplicada a um microrganismo, a bactéria <i>Escherichia coli</i> , que foi considerada o primeiro organismo geneticamente modificado (OGM)
Genética	Herbert Boyer e Robson Swanson	1976	Fundação da Genentech em San Francisco, que marca a inauguração da indústria de biotecnologia
Engenharia genética	Herbert Boyer e Robson Swanson	1978	A bactéria <i>E. coli</i> é usada para produzir insulina na forma humana pelos cientistas da empresa Genentech
Engenharia genética	Pesquisadores belgas	1983	Surge a primeira planta transgênica: uma variedade de tabaco com gene de resistência ao antibiótico canamicina
Genética e biologia molecular	Consórcio internacional	1990	Início do Projeto Genoma Humano, com o objetivo de mapear o genoma humano e identificar todos os nucleotídeos que o compõem
Genética e biologia molecular	Pesquisadores escoceses	1997	Clonagem da ovelha Dolly
Genética e biologia molecular	Consórcio internacional	2003	Anúncio da conclusão do Projeto Genoma Humano (PGH): mapeamento do genoma humano e identificação de todos os nucleotídeo que o compõem

2. Aplicações da Biotecnologia

2.1. Cultura de Células, Tecidos e Órgãos de Plantas

Entre as diversas aplicações da biotecnologia moderna, uma das mais promissoras é a cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. Um dos primeiros fundamentos do cultivo in vitro de plantas foi a formulação da teoria da totipotencialidade por Matthias Schleiden & Theodor Schwann, em 1838, na qual a célula é autônoma e capaz de originar um organismo completo, desde que determinadas condições físicas e nutricionais sejam providas à célula vegetal em cultivo. Em 1902, estudos realizados por Haberlandt chamaram a atenção, pois relatavam os primeiros trabalhos de cultivo de tecidos somáticos de plantas (KERBAUY, 1997). Mas a teoria da totipotência só começou a se confirmar a partir da multiplicação de trabalhos na área, entre os quais se destacaram o do cultivo in vitro de embriões imaturos de crucíferas por Hanning (1904), o cultivo de embriões de híbridos interespecíficos de orquídeas por Knudson (1922) e a recuperação de embriões a partir de híbridos incompatíveis de *Linum* por Laibach (1925).

A descoberta e utilização de fitormônios, especialmente auxinas e citocininas, tiveram importância fundamental para o avanço das técnicas de cultura de tecidos de plantas, visto que essas substâncias possuem grande influência no padrão de desenvolvimento vegetal (KOGH et al., 1934; MILLER et al., 1955 citados por SÁ et al., 2000). Desde então, inúmeras aplicações da cultura de tecidos de plantas têm sido verificadas em diversas áreas da agricultura, como: melhoramento genético de plantas, recuperação de genótipos livres de vírus e outros agentes patogênicos, micropropagação comercial de plantas, transformação genética, cultivo de suspensões celulares, biossíntese de metabólitos secundários em biorreatores, conservação e intercâmbio de germoplasma, obtenção de plantas haplóides por meio da cultura de anteras, obtenção de variantes somaclonais, microenxertia e cultura de protoplastos.

2.2. Cultura de Células, Tecidos e Órgãos de Plantas: Vantagens e Limitações

Várias têm sido as vantagens associadas à utilização de técnicas de cultura de células, tecidos e órgãos de plantas (Tabela 2).

Tabela 2. Vantagens e limitações da técnica de cultura de células, tecidos e órgãos de plantas.

Vantagens	Limitações
É realizada em qualquer época do ano	Necessidade de estrutura física adequada e mão-de-obra qualificada
Necessita de pequeno espaço físico e pouca quantidade de material vegetal inicial	Risco de implantar clones em extensas áreas de cultivo
Propicia elevadas taxas de multiplicação a partir de um único propágulo (explante)	Custo relativamente elevado para a implantação laboratorial
É aplicável a um grande número de espécies, principalmente àquelas que não produzem sementes ou possuem limitações para sua germinação, bem como às plantas que produzem baixa quantidade de propágulos por métodos convencionais	Equipamentos, reagentes, solventes e vidrarias específicas
Permite a produção de mudas com elevado padrão genético e fitossanitário (genótipos elites)	Produção de compostos tóxicos in vitro
Possibilita ao pesquisador explorar melhor a variabilidade genética das espécies	Dificuldade de trabalhar com espécies lenhosas
Permite a produção de plantas mais uniformes em curto período de tempo	Perdas na aclimatização de plantas
Controla efetivamente agentes patogênicos	Risco de variação somaclonal
Facilita o manuseio e transporte de material propagativo, tanto para áreas de cultivo quanto entre instituições de pesquisa e ensino (intercâmbio de germoplasma)	

2.3. Micropropagação

A propagação in vitro de plantas, também conhecida como micropropagação, tem sido indiscutivelmente a técnica mais utilizada e de maior aplicabilidade entre todas as demais. O uso da micropropagação em escala comercial teve início na Europa, ainda na década de 60, especialmente com espécies ornamentais (LAMEIRA et al., 2000).

Atualmente, a micropropagação tem sido aplicada em diversos países e em inúmeras espécies de plantas, com êxito não apenas em espécies frutíferas (bananeira, abacaxizeiro, macieira) e ornamentais (orquídea, crisântemo, helicônia), mas também em florestais (eucalipto, pinus), medicinais (ipeca, espinheira-santa) e olerícolas (batata, cenoura, morango). Atualmente, são produzidas em torno de 180 a 200 milhões de plantas/ano via cultura de células e tecidos (ANDRADE et al., 2000; LAMEIRA et al., 2000). Esta expansão foi atribuída em grande parte a conhecimentos adicionais, adquiridos na área de patologia, que demonstraram a eficiência na obtenção de plantas livres de agentes patogênicos, particularmente viroses (ASSIS et al., 2000). Na Fig. 1 podem-se observar as etapas básicas da micropropagação vegetal.

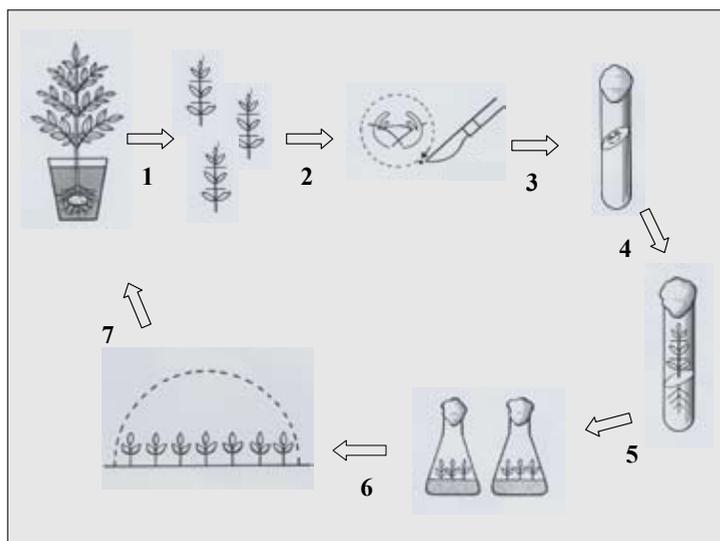


Fig. 1. Etapas da micropropagação: 1) obtenção do material vegetal em campo e desinfestação superficial; 2) isolamento de explantes com porção meristemática; 3) explante em meio de cultura; 4) explante desenvolvido; 5) multiplicação e enraizamento; 6) acclimatização; 7) transferência para telado/campo ou retorno para o início do processo in vitro.

Fonte: Adaptada de Pereira; Ledo, 2002.

2.4. Embriogênese Somática

Embriogênese somática, adventícia ou assexual são termos usualmente empregados ao processo pelo qual células haplóides ou somáticas desenvolvem-

se por meio de diferentes estádios embriogênicos, dando origem a uma planta, sem que para isso ocorra a fusão de gametas (WILLIAMS; MAHESWARAM, 1986). Foi originalmente desenvolvida para satisfazer dois objetivos: micropropagação massal e desenvolvimento de ferramenta celular para a melhoria genética, como por exemplo, a transformação genética e a fusão de protoplastos. Esta técnica consiste no uso de reguladores de crescimento (auxinas) para induzir a desdiferenciação de tecidos e a formação de tecidos e/ou células embriogênicas que, ao final, servirão para o desenvolvimento de plantas inteiras (STROSSE et al., 2003).

Uma particularidade dos embriões somáticos é a presença de um sistema vascular fechado, sem conexão com os tecidos do explante inicial, característica esta que aliada à sua bipolaridade (estrutura constituída de ápice caulinar e radicular) os diferem dos propágulos obtidos por meio da micropropagação e da organogênese (GUERRA et al., 1998).

Devido ao seu considerável potencial de multiplicação, a embriogênese somática constitui uma importante ferramenta para a propagação clonal em larga escala de plantas elites (ETIENNE-BARRY et al., 1999). Porém, apesar do alto potencial de regeneração, esta técnica pode, em determinados casos, não ser indicada para a produção massal de algumas espécies de plantas, como a bananeira, pela possibilidade de incremento no nível de variação somaclonal, quando comparada a outras técnicas clássicas de propagação, como a cultura de ápices caulinares. No entanto, nesta cultura, a embriogênese somática pode justificar-se para trabalhos que envolvam transformação genética e fusão de protoplastos (STROSSE et al., 2003).

Atualmente, a embriogênese somática já foi relatada para mais de 300 espécies e para as mais diferentes finalidades, incluindo desde a produção massal de plantas até a produção de plantas transgênicas e sementes sintéticas.

2.5. Limpeza Clonal

A utilização de técnicas de cultura de tecidos para obter plantas livres de patógenos é bastante difundida nos dias atuais. Maior atenção tem sido dada ao cultivo de meristemas e ápices meristemáticos visando à produção de plantas livres de vírus, devido à diversidade de espécies infestadas, como o mamoeiro, batata, morangueiro, mandioca e bananeira.

Esta técnica refere-se à cultura propriamente dita do meristema ou do ápice meristemático (meristema recoberto por primórdios foliares), geralmente com dimensões não superiores a 1,0 mm. Embora a regra geral seja que a utilização de explantes menores aumente a chance de sucesso na obtenção de plantas livres de patógenos, quanto menor o tamanho do propágulo a ser cultivado, mais difícil será sua sobrevivência e desenvolvimento *in vitro*.

O uso de explantes meristemáticos para a produção de plantas livres de vírus se deve ao fato de ser o meristema o explante mais indicado na multiplicação clonal *in vitro*, permitindo inclusive a obtenção de clones sadios a partir de plantas infectadas. Acredita-se que a maior atividade de síntese

protéica no tecido meristemático e a incipiente ligação vascular do meristema com o restante dos tecidos da planta desfavoreçam a multiplicação do patógeno e proporcionem uma menor distribuição das partículas patogênicas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990).

Além de permitir a produção ou a recuperação de plantas livres de patógenos, outra vantagem da limpeza clonal é a manutenção da identidade genética da planta regenerada, já que esse tecido é de origem somática. Some-se a isso o fato de ser o ápice uma estrutura organizada, que pode se desenvolver diretamente em parte aérea, em meio de cultura adequado, sem passar pela fase de calo (crescimento desordenado de células), o que poderia ocasionar alterações genéticas no material (PEREIRA; MELO, 2006).

Inúmeras espécies, entre as quais amendoim, morangueiro, batata e bananeira, já obtiveram êxito na eliminação de vírus (GAMA, 1988; MORRIS et al., 1997; COLLIN; EDWARDS, 1998; HELLIOT et al., 2001). No que se refere à eliminação de fungos, também foram alcançados resultados positivos com cravo e gladiolo infectados por *Fusarium roseum* e *F. oxysporum*, respectivamente (PIERIK, 1990). Albuquerque et al. (2000), avaliando a viabilidade do uso da técnica de ápices caulinares in vitro para a limpeza clonal de plantas de abacaxizeiro infectadas por *Fusarium subglutinans*, verificaram que ápices caulinares de aproximadamente 1,0 mm apresentaram 100% das plantas regeneradas livres de patógenos (fusariose). Já Helliott et al. (2001) observaram que a taxa de eliminação de vírus em genótipos de bananeira infectados é altamente dependente do tipo de vírus (CMV, BBTV e BSV).

2.6. Microenxertia

A microenxertia foi utilizada como técnica de micropropagação e eliminação de viroses, inicialmente por Murashige et al. (1972), e aperfeiçoada por Navarro et al. (1975), tornando-se eficiente na obtenção de plantas de citros livres de vírus. Também tem sido aplicada em macieira, damasqueiro, videira, pereira e marmeleiro, trazendo inúmeras vantagens, como a obtenção de plantas livres de patógenos sistêmicos, detecção precoce de incompatibilidade entre espécies, estudo das relações entre porta-enxertos e copas e estudo de combinações específicas entre genótipos adaptados a condições edáficas para incrementar a produtividade da planta.

A microenxertia consiste em enxertar um meristema ou ápice caulinar com um a dois primórdios foliares, oriundo de uma planta matriz, sobre um porta-enxerto multiplicado in vitro (geralmente obtido por meio de germinação de sementes in vitro) (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). No Centro de Citricultura Sylvio Moreira do Instituto Agrônomo de Campinas (CCSM-IAC), a microenxertia de ápices caulinares tem sido efetiva na eliminação do vírus-da-tristeza (*Citrus Tristeza Virus*, CTV) e dos viróides da exocorte (*Citrus exocortis viroid*, CEVd) e cachexia/xiloporose. No entanto, para alguns vírus como aqueles do complexo da sorose, somente a microenxertia pode não ser

100% eficiente, sendo necessário associá-la com a termoterapia para maior segurança nos trabalhos de limpeza clonal (CARVALHO et al., 2002).

Para a propagação clonal de árvores adultas de *Eucalyptus*, a microenxertia apresenta-se como uma estratégia com alto potencial de aplicação no rejuvenescimento de clones, conforme sugerido por outros trabalhos com espécies frutíferas e florestais.

2.7. Conservação in Vitro e Intercâmbio de Germoplasma

Em razão da intensa atividade extrativista de espécies nativas e endêmicas, assim como pela expansão desordenada de novas áreas de cultivo, é importante que medidas de conservação de germoplasma sejam empregadas, principalmente para as espécies ameaçadas de extinção. Nesse sentido, considera-se o uso de técnicas de conservação in vitro como método promissor à conservação de recursos genéticos vegetais, sendo uma opção atrativa tanto do ponto de vista econômico, quanto prático. Segundo Withers (1980), citado por Sá et al. (2000), as técnicas de culturas de tecidos de plantas podem contribuir em todas as etapas do processo de conservação de germoplasma, incluindo coleta, indexação para doenças, quarentena, multiplicação, caracterização, avaliação, armazenamento e distribuição.

De modo geral, a conservação in vitro fundamenta-se na manutenção de coleções em laboratório. Para tanto, realizam-se alterações no ambiente de cultivo, como redução da temperatura, adição de retardantes osmóticos e hormonais ao meio de cultura, redução das concentrações salinas e dos componentes orgânicos do meio de cultivo, submersão das culturas em óleo mineral ou armazenamento de propágulos, isoladamente ou em associação, a ultrabaixas temperaturas (-196°C), denominado criopreservação (GEORGE, 1993). O objetivo principal é desacelerar ou suprimir o crescimento de células, tecidos e órgãos, aumentando ao máximo o intervalo entre os subcultivos, fato que conseqüentemente reduziria a mão-de-obra e o espaço necessários para a sua conservação. Dentre as vantagens da conservação in vitro, citam-se: a manutenção de um grande número de acessos num pequeno espaço físico e livre dos riscos ambientais existentes no campo, acesso imediato a todo o germoplasma da coleção (GEORGE, 1993), além da facilidade de intercâmbio internacional de germoplasma entre instituições de pesquisa.

De acordo com Engelmann (2004), a utilização das técnicas de cultura in vitro é de grande interesse para a conservação de germoplasma de espécies com sementes recalcitrantes, espécies que apresentem baixa viabilidade de sementes ou baixa produção e aquelas que se propagam vegetativamente, ou ainda genótipos elites e material geneticamente modificado.

Contudo, o sucesso do uso desta técnica depende das características fisiológicas da espécie a ser conservada. Entre os tecidos e órgãos empregados, os meristemas são os mais indicados, devido à menor probabilidade de ocorrência de alterações genéticas, por serem livres de patógenos e, na maioria das vezes, os melhores explantes para a micropropagação.

Diversas são as culturas em que a conservação in vitro tem sido empregada com sucesso: mandioca, bananeira, abacaxizeiro, batata, cafeeiro, orquídeas, espécies florestais, kiwi, macieira, pereira, ameixeira, cerejeira, videira, morangueiro, maracujazeiro, beterraba, batata-doce, forrageiras e cana-de-açúcar.

No Brasil, germoplasma de várias espécies de plantas tem sido conservado in vitro ou criopreservado, como na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília. Outras instituições de destaque na conservação in vitro de germoplasma são o Cirad em Montpellier, na França, e o Inibap em Leuven, Bélgica (VIEIRA, 2000).

Particularmente para a cultura da mandioca, a conservação in vitro constitui uma das formas mais efetivas e econômicas de preservação do germoplasma. Atualmente, grande número de acessos de mandioca são mantidos in vitro no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (FUKUDA et al., 2005), como também têm sido conservados genótipos de abacaxizeiro visando à proteção do patrimônio genético da espécie, assim como para utilização em futuros cruzamentos e formação de novos híbridos (SOUZA et al., 2006).

Apesar das potencialidades acima mencionadas, existe o risco de instabilidade genética das culturas submetidas às técnicas de conservação in vitro. Além disso, os sistemas in vitro não eliminam por completo a necessidade de se manter recursos genéticos in situ, pois são métodos que se completam e ambos podem constituir bancos ativos de germoplasma. No entanto, dependendo da espécie e do objetivo, pode tornar-se dispendioso manter coleções in situ, principalmente pelas intempéries e necessidade de grandes áreas e práticas de manejo (VIEIRA, 2000).

Em relação ao intercâmbio de germoplasma por meio de cultura in vitro, tem-se notado consideráveis vantagens práticas por proporcionar menor volume e peso dos materiais destinados ao transporte, assim como também pela facilidade de maior controle das culturas com relação às doenças. Rotineiramente o intercâmbio de germoplasma in vitro é aplicado para bananeira, batata e mandioca que em geral são transportadas como brotos em meio de cultivo ou como minitubérculos no caso de culturas como batata e inhame (NG, 1994). Outras ferramentas biotecnológicas, como a tecnologia de sementes sintéticas, foram utilizadas como alternativa de distribuição de germoplasma de bananeira (RAO et al., 1993) por meio do encapsulamento de microbrotos, assim como para inhame e batata (HASAN; TAKAGI, 1995) utilizando o encapsulamento de segmentos nodais.

2.8. Cultura de Embriões Zigóticos

Desde os estudos de Hanning (1904) acerca da fisiologia e do desenvolvimento de embriões, a técnica de cultivo destes tem se expandido e contribuído para programas de melhoramento genético, por meio da recuperação de híbridos de interesse oriundos de cruzamentos incompatíveis, bem como para a superação de dormência de sementes em algumas espécies (FERREIRA et al., 1998).

As principais aplicações do cultivo de embriões zigóticos in vitro estão na coleta, intercâmbio e conservação de germoplasma e na propagação de híbridos raros, que não germinam por meio de processos naturais. Além disso, o cultivo de embriões zigóticos pode ser coadjuvante no processo de introdução de genes exógenos no genoma de um organismo (HU; FERREIRA, 1998; SILVA, 2002), como também para viabilizar a produção racional de mudas, uniformizando e reduzindo o período de germinação de sementes (SILVA, 2002). Além do mais, pode oferecer um sistema controlado para estudar os problemas nutricionais, fisiológicos e bioquímicos nos diferentes estágios de desenvolvimento do embrião (RAGHAVAN, 2003).

Em citros, a ocorrência de poliembrionia entre as espécies resulta, normalmente, em elevada taxa de aborto do embrião zigótico, devido à competição exercida sobre ele pelos embriões nucelares, geralmente mais vigorosos (PASQUAL et al., 2003). Assim, a cultura de embriões é de grande importância no melhoramento genético de citros, pois possibilita o resgate de embriões híbridos imaturos, oriundos de cruzamentos interespecíficos e intergenéricos (HU; FERREIRA, 1998).

A técnica de cultura de embriões tem sido empregada também em *Cocos nucifera* L. (SILVA, 2002), *Coffea* sp. (ANDRADE et al., 2001; RIBEIRO et al., 2003), *Euterpe oleracea* L. (LEDO et al., 2001), *Aniba rosaeodora* Ducke (HANDA et al., 2005), *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc. (MELO et al., 2001), *Astrocaryum ulei* (PEREIRA et al., 2006), entre outras.

2.9. Produção de Sementes Sintéticas ou Artificiais

A aplicação da tecnologia de sementes sintéticas ou artificiais tem sido crescente nos últimos dez anos, principalmente com o propósito de conservar germoplasma vegetal in vitro, como também para facilitar o intercâmbio de germoplasma entre instituições de pesquisa e para a produção massal de plantas. Seu emprego é destinado àquelas espécies que apresentam barreiras ao armazenamento por longos períodos ou que possuem alguma limitação durante o processo de propagação in vitro.

Sementes sintéticas são estruturas artificiais criadas com o objetivo de torná-las semelhantes à semente verdadeira ou botânica, obtidas pelo encapsulamento de micropropágulos (embriões somáticos, brotos, agregados celulares ou algum outro tecido que seja capaz de se converter em plantas normais), sob condições in vitro ou ex vitro, conservando o potencial de desenvolvimento, mesmo depois de um período de armazenamento.

Inicialmente, o uso de sementes sintéticas se limitava ao encapsulamento de embriões somáticos. Atualmente, esta tecnologia tem sido aplicada para uma grande diversidade de explantes como, por exemplo, brotos axilares e apicais, agregados celulares, segmentos internodais, protocormos e embriões zigóticos (PICCIONI; STANDARDI, 1995; PICCIONI, 1997; CAPUANO et al., 1998; STANDARDI; PICCIONI, 1998; PATEL et al., 2000; SANDOVAL; GUERRA, 2002; RECH FILHO, 2004).

Na Fig. 2 podem ser observadas as diferentes aplicações de cultura de células, tecidos e órgãos de plantas realizadas no Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular da Embrapa Acre.

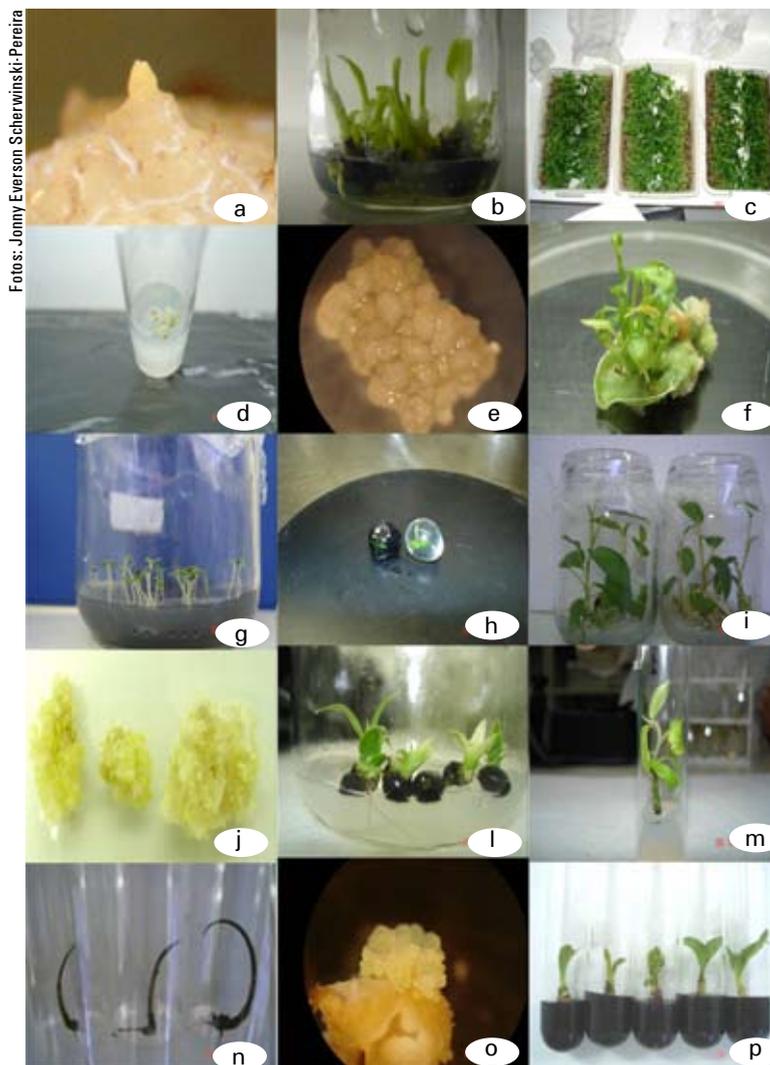


Fig. 2. Aplicações da cultura de células, tecidos e órgãos de plantas resultantes da pesquisa na Embrapa Acre: a) meristema apical ($\leq 0,5$ mm) de bananeira utilizado na recuperação de plantas viróticas; b) brotações de bananeira sob multiplicação in vitro; c) mudas de bananeira produzidas por micropropagação; d) sementes de camapu em meio de cultura para germinação; e) massivos celulares embriogênicos induzidos em camapu; f) organogênese direta de explantes foliares de camapu na presença de citocininas; g) sementes de pimenta longa germinadas in vitro; h) sementes sintéticas de pimenta longa em matriz de encapsulamento com e sem a presença de carvão ativado; i) micropropagação da pimenta longa; j) calos friáveis de pimenta longa produzidos a partir de internódios; l) sementes sintéticas de abacaxizeiro em processo de germinação e desenvolvimento; m) microestaca de sacaca sob multiplicação in vitro; n) germinação de embriões zigóticos de açazeiro in vitro; o) embriogênese somática em açazeiro a partir de embriões zigóticos imaturos; p) microestacas de teca estabelecidas in vitro.

2.10. Cultivo de Células em Suspensão

O cultivo de células em suspensão consiste em obtê-las e proliferá-las em meio nutritivo líquido, sob condições de agitação, aeração e temperatura controlada, sendo essencial que as células suspensas se dividam e se multipliquem ativamente (CID, 1998). Contudo, salienta-se que de acordo com a composição do meio de cultivo, o padrão de diferenciação (lignificação e/ou alongamento), divisão e senescência celular podem ser afetados.

A vantagem desta técnica deve-se a sua elevada taxa de multiplicação celular, sendo desta forma eficiente para a rápida multiplicação, e ao fato de ter aplicações diretas em estudos de bioquímica, genética, citologia, fisiologia vegetal e fitopatologia. Este tipo de cultivo também é empregado na produção de metabólitos secundários ou material clonal em escala comercial pela utilização de biorreatores (PEREIRA; MELO, 2006).

Porém, dois aspectos devem ser considerados no cultivo de células em suspensão: a formação de agregados celulares e a existência de mosaicismo ou mixoploidia, isto é, a coexistência de diferentes populações celulares com bases genéticas distintas. Atualmente, vários são os estudos com células vegetais cultivadas em reatores biológicos visando à produção de metabólitos secundários.

2.11. Cultura de Ovários

Esta técnica fornece um controlado sistema para estudos acerca dos aspectos nutricionais e fisiológicos do desenvolvimento de frutos, bem como para a formação de sementes e para uso como propagação de plantas, indução de haplóides partenogênicos, recuperação de híbridos interespecíficos e intergenéricos (HARA et al., 1989; CASTILLO; CISTUÉ, 1993; ROH et al., 1996; BROWN et al., 1997).

2.12. Cultura de Protoplastos

Definem-se protoplastos como células vegetais que por meio de procedimentos mecânicos ou enzimáticos tiveram sua parede celular removida. Assim, células vegetais sob essa condição podem ser manipuladas, conservando ainda as suas potencialidades. A priori, protoplastos podem ser isolados de qualquer tecido vegetal, mas geralmente preferem-se tecidos como o do mesófilo foliar ou de calos friáveis. É uma técnica aplicável em diversas áreas da pesquisa vegetal, mas é principalmente no melhoramento genético de plantas que se vislumbram as maiores potencialidades de uso. Assim, pode ser empregada para obter plantas transgênicas, híbridos somáticos e mutantes ou variantes somaclonais, além de possibilitar estudos da expressão gênica e sua regulação (MANTELL et al., 1994; CARNEIRO et al., 1998; SÁ et al., 2000).

A partir da década de 80 a hibridação somática pela fusão de protoplastos também passou a ser utilizada em programas de melhoramento de citros, superando as barreiras genéticas impostas à hibridação sexual e possibilitando obter alotetraplóides que combinam o genoma nuclear de ambos os parentais (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990).

Atualmente, a cultura de protoplastos vem sendo empregada em estudos básicos na área de fisiologia vegetal, biologia molecular e celular e pesquisas aplicadas em biotecnologia.

2.13. Obtenção de Mutantes in Vitro

Mutações são definidas como mudanças herdáveis que representam as bases genéticas das variações, podendo servir, portanto, como matéria-prima aos processos de melhoramento genético e evolutivo (RAMALHO et al., 2000). Como a ocorrência de mutações espontâneas é muito baixa, requer a utilização de métodos mais eficientes, como o emprego de agentes mutagênicos físicos ou químicos.

Técnicas que induzem à mutação associadas às de seleção in vitro têm sido recomendadas, por facilitar não apenas a indução de variabilidade genética, mas também por permitir a seleção e a propagação de mutantes promissores (MARK et al., 1996). Estas técnicas foram empregadas com sucesso em bananeira para redução do porte e tolerância à salinidade ou em outras espécies para a obtenção de tolerância a metais pesados, herbicidas e a certas doenças (TULMANN NETO et al., 1990; KIDO, 2003).

2.14. Produção de Plantas Transgênicas

A cultura de tecidos é fundamental em estudos que visam obter plantas geneticamente modificadas. Sua utilização é requerida em praticamente todo o processo, incluindo desde a transformação propriamente dita (biobalística, *Agrobacterium tumefaciens*, etc.) até a regeneração e multiplicação das plantas transformadas (SÁ et al., 2000). Contudo, cabe salientar que o sucesso do uso da cultura de tecidos na obtenção de plantas transgênicas está condicionado à otimização de protocolos para cada espécie utilizada.

2.15. Algumas Culturas nas quais a Técnica de Cultivo in Vitro é Empregada

A produção de mudas por clonagem in vitro é, atualmente, de grande importância por ofertar ao mercado produtos diferenciados, certificados, de alta qualidade genética e fitossanitária e que promovam ganhos de diferentes formas, como produtividade, lucratividade, facilidade de transporte e redução no uso de agroquímicos. Portanto, nos últimos anos, as tecnologias de produção de mudas têm evoluído sobremaneira em virtude das exigências fitossanitárias e padrões comerciais cada vez mais rigorosos e exigentes.

Assim como descrito anteriormente, muitas são as culturas favorecidas por esta ferramenta biotecnológica e várias são as empresas que utilizam esta técnica no Brasil para produzir em escala mudas de alta qualidade genética e fitossanitária.

a) Bananeira

A utilização das técnicas de cultura de tecidos, mais especificamente a micropropagação de ápices caulinares, já é realidade em vários países como Israel, França, Costa Rica, Cuba, Austrália e Taiwan (SOUZA, 1994). Os relatos das primeiras aplicações da micropropagação na multiplicação de espécies do gênero *Musa* datam da década de 60, intensificando-se desde então os trabalhos de pesquisas visando ao uso de técnicas mais simples e produtivas para o cultivo da bananeira.

A produção de mudas em laboratório consiste no cultivo in vitro de ápices caulinares obtidos de plantas matrizes elites, com o objetivo de estimular a proliferação de brotações laterais, utilizando-se para isso métodos físicos (incisões) e químicos (adição de reguladores de crescimento vegetal no meio de cultura) (DOMINGUES, 1992). Outros métodos menos usuais, como o cultivo de ápices florais, também podem ser empregados para a produção de multibrotações in vitro.

Atualmente, com a expansão de doenças, especialmente a sigatoka-negra (*Mycosphaerella fijiensis*), principal praga da bananicultura mundial, a busca por genótipos selecionados e resistentes tem se intensificado. Neste contexto, a micropropagação representa a principal forma de validar as novas variedades produzidas por programas de melhoramento genético da bananeira, pois possibilita aos produtores o imediato acesso às novas variedades lançadas (ROCHA, 2005).

Uma série de trabalhos foi e tem sido desenvolvida com o objetivo de estabelecer e otimizar protocolos de micropropagação para genótipos de bananeira. Porém, apesar dos esforços, para cada genótipo existe um comportamento diferenciado, o que implica em modificações ou adaptações dos protocolos.

Contudo, apesar de ser uma técnica rotineira e fundamental no cenário da bananicultura, ainda existem limitações à expansão do uso de mudas micropropagadas de genótipos elites de bananeira por pequenos produtores, devido aos elevados custos de produção. Entretanto, esforços têm sido feitos visando superar estas limitações, como o uso de luz natural (solar) durante as diferentes etapas da micropropagação (ROCHA, 2005).

Na Fig. 3 podem ser observadas a comercialização e distribuição de mudas de bananeira entre os anos de 1999 a 2003. Verifica-se a preferência por variedades resistentes à sigatoka-negra, que foram enviadas para vários estados do País, em maior quantidade para a Região Norte, onde se constatou o primeiro relato da praga.

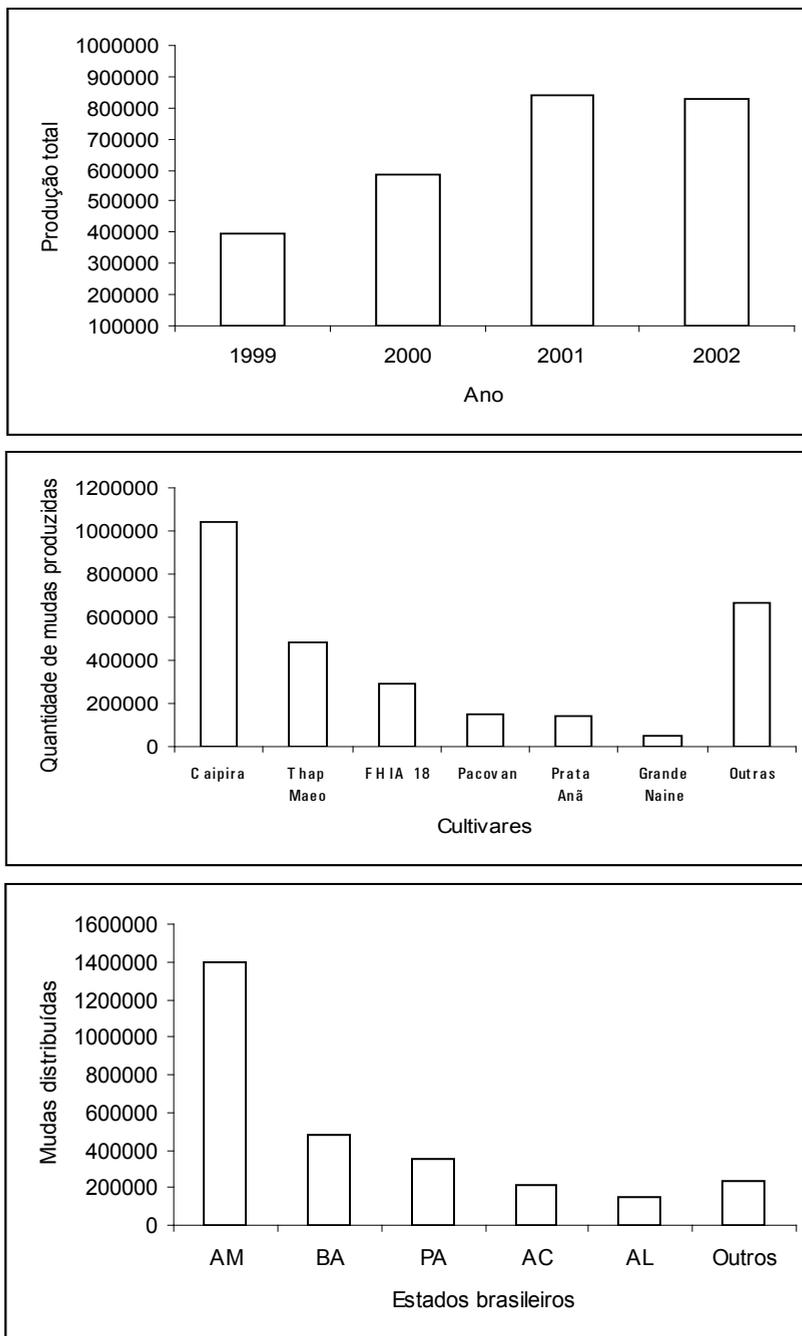


Fig. 3. Evolução da produção (1999 a 2002), quantidade de mudas produzidas por cultivar (1999 a maio de 2003) e número de mudas distribuídas de bananeira para diferentes estados da Federação (1999 a maio de 2003) pela Biofábrica da Campo Biotecnologia, Cruz das Almas, BA, 2003.

Fonte: Adaptada de Silva et al., 2003.

b) Abacaxizeiro

Em virtude dos métodos tradicionais de propagação do abacaxizeiro ocasionarem a disseminação de patógenos, como a fusariose (*Fusarium moniliforme* Shilld. var. *Subglutinans* Wr. e Reinking), principal doença fúngica que pode provocar perdas de 80% da produção, a cultura de tecidos representa uma alternativa viável na propagação de genótipos livres da doença (VESCO et al., 2000). Além de reduzir os custos com a mão-de-obra, o cultivo in vitro de gemas axilares e/ou meristemas melhora sensivelmente o problema de baixo rendimento de mudas observado na propagação convencional. Dessa forma, a cultura de tecidos pode ser utilizada não apenas para a produção em escala de mudas, mas também para multiplicação rápida de genótipos selecionados em programas de melhoramento, especialmente híbridos resistentes à fusariose, disponibilizando maior quantidade de mudas em pouco tempo (PASQUAL et al., 1998). Para tanto, utilizam-se como explantes gemas da base das folhas ou meristemas apicais, procedentes de plantas matrizes selecionadas.

Muitos autores têm reportado casos de sucesso do uso da micropropagação em abacaxizeiro. De acordo com Almeida et al. (2002), é possível produzir 1.250.000 plantas de abacaxi em 8 meses, partindo-se de 30 explantes.

No entanto, embora a cultura de gemas axilares seja a mais empregada, outras técnicas também podem ser utilizadas, como a proposta por Kiss et al. (1995) a qual se baseia no estiolamento in vitro de brotos desfolhados e incubados na ausência de luz. A grande vantagem da utilização deste método é o maior alongamento entre os internódios, proporcionando aumento no número de gemas obtidas por explante (PRAXEDES et al., 2001).

Entre as principais vantagens do emprego de técnicas de cultura de tecidos em abacaxizeiro encontram-se a obtenção de plantas de alto vigor e uniformidade, ausência de pragas e doenças, mudas enraizadas e prontas para serem cultivadas no campo e disponibilidade de material durante todo o ano. Apesar das diversas vantagens, a principal limitação para o uso de mudas micropropagadas em lavouras comerciais é o elevado custo da muda produzida, bem superior ao da convencional. Tal fato se agrava ainda mais porque são empregadas elevadas densidades de plantas por hectare (em torno de 40 mil plantas). Assim, pesquisas têm sido feitas com o intuito de reduzir os custos de produção, entre elas, a utilização de fontes alternativas de luz e o emprego de biorreatores (SILVA, 2006), além do uso de substituintes do agente solidificante ágar do meio de cultura (PEREIRA et al., 2004).

Além disso, a técnica de micropropagação é particularmente importante quando o objetivo refere-se à introdução da cultura em novas regiões de plantio, onde ainda não existem problemas fitossanitários; introdução/substituição de novas cultivares, quando não se dispõe de mudas convencionais dessas cultivares para iniciar grandes plantios; multiplicação rápida de genótipos selecionados pelos programas de melhoramento genético, antes do lançamento de novas cultivares; produção de material básico para atender a programas de

produção de mudas certificadas; e intercâmbio de germoplasma para evitar a introdução de pragas e doenças exógenas.

c) Batata

Dentre as técnicas de cultura de tecidos, a micropropagação vem sendo amplamente utilizada para produzir genótipos elites de batata (*Solanum tuberosum* L.), proporcionando benefícios diretos e indiretos aos produtores, pelo conseqüente aumento nos níveis de produtividade da cultura (ASSIS, 1999). Pereira e Fortes (2003), estudando o efeito do cultivo in vitro de batata em meio de consistência líquida, verificaram ser promissor o uso da metodologia para a micropropagação desta espécie, devido ao incremento nas taxas de multiplicação nestas condições.

Atualmente, as empresas de micropropagação comercial têm sido as grandes responsáveis pela disponibilidade aos produtores de mudas de batata de elevado padrão genético e fitossanitário, utilizando a cultura de meristemas, micropropagação e aclimatização em estufas. Além disso, todos os genótipos introduzidos in vitro são submetidos ao processo de indexação oficial de viroses, feito por amostragens de todos os lotes produzidos.

d) Cana-de-açúcar

A propagação in vitro é bastante vantajosa para a cana-de-açúcar, considerando que um dos maiores problemas enfrentados em programas de melhoramento genético convencional nessa cultura é a dificuldade de multiplicar o material selecionado com rapidez. Normalmente, antes do uso da micropropagação, além do excessivo tempo de seleção de genótipos em campo, eram requeridos mais alguns anos para se estabelecer novas cultivares em plantios comerciais (DONATO et al., 2005). Assim como citado para as outras culturas, podem-se alcançar altas taxas de multiplicação de cana-de-açúcar por esse método, com inúmeras vantagens em relação à multiplicação em campo, como a produção de grande quantidade de mudas de qualidade superior, em tempo e espaço físico reduzidos (MALHOTRA, 1995).

e) Palmeiras

O interesse pelo uso das técnicas de cultura de tecidos em palmeiras visando à produção massal de clones elites teve início na década de 60, pois muitas palmeiras, de modo geral, apresentavam limitações à aplicação de técnicas de multiplicação vegetativa. Acrescenta-se a isso o fato dos métodos tradicionais de melhoramento genético de palmáceas serem demorados e complexos, assim como também o longo ciclo de vida, hábito de crescimento das plantas e ausência quase que completa de métodos eficientes de propagação vegetativa. Contudo, foi na década de 80 que os estudos acerca de técnicas de micropropagação e morfogênese se intensificaram, principalmente em espécies como *Phoenix dactylifera* (tamareira), *Elaeis guineensis* (dendezeiro), *Cocos nucifera* L. (coqueiro), *Euterpe edulis* Mart. (juçara) e palmeiras ornamentais. Assim, torna-se evidente a importância dos sistemas de culturas in vitro para aumentar a rapidez dos programas de melhoramentos de palmeiras e introduzir novos híbridos ou variedades comercialmente.

No Brasil, embora haja relatos de resultados promissores com o emprego da técnica de cultura de tecidos em algumas palmáceas, poucas são as conclusões consistentes sobre os protocolos a serem usados para a produção massal de genótipos elites comercialmente. Apesar de países como a França já terem utilizado esta técnica para a cultura do dendezeiro há pelo menos duas décadas (RIVAL et al., 1998), com a produção de milhares de plantas (DURAND-GASSELIN et al., 1990), praticamente não existem estudos mais consistentes no Brasil. Na Embrapa Acre, pesquisas a respeito do desenvolvimento de tecnologia para a micropropagação de espécies de palmeiras como o dendezeiro, pupunheira e açazeiro têm revelado resultados promissores acerca do emprego desta tecnologia para a multiplicação clonal dessas espécies, muito embora os processos ocorram de modo lento e ainda não estejam totalmente otimizados (LEDO et al., 2002; PEREIRA et al., 2004; 2005, 2006a, b).

f) Plantas Ornamentais

O cultivo de plantas ornamentais é uma atividade competitiva, altamente rentável e que exige a utilização de tecnologias e conhecimento técnico (BALDONEDO, 2005). Estima-se que mais de 500 milhões de plantas são propagadas anualmente, na sua maioria ornamentais, utilizando-se a aplicação de técnicas de cultura de tecidos (DEBERGH, 1994). Acrescenta-se ainda que as espécies ornamentais são por excelência o grupo de plantas em que a micropropagação teve maior aplicação, com essa técnica repercutindo diretamente na cadeia produtiva. O incentivo para esse crescimento fundamenta-se no alto valor agregado ao produto final (CAPELLADES-QUERALT et al., 1993).

De acordo com Tombolato e Costa (1998), o emprego da micropropagação em plantas ornamentais apresenta grandes vantagens, principalmente para espécies de difícil propagação por meio de métodos convencionais. Atualmente, o cultivo *in vitro* tem sido amplamente utilizado na multiplicação de orquídeas, antúrios, violeta-africana, bromélias e samambaias e, em menor escala, para propagação de alstroeméria, amarflis, begônias, ciclame, copo-de-leite, gloxínia e espatifilo. Além disso, a clonagem *in vitro* de matrizes selecionadas de híbridos ornamentais tem permitido a compatibilização de demandas específicas dos mercados interno e externo (KERBAUY, 1997).

g) Espécies Florestais

O emprego da micropropagação em espécies florestais vem sendo estudado há várias décadas e tem como objetivo básico estabelecer uma metodologia de multiplicação clonal de indivíduos superiores. Entretanto, de modo geral as espécies florestais apresentam problemas para o estabelecimento e cultivo *in vitro*, principalmente por serem rotineiramente infectadas por microorganismos endógenos, dificultando o controle e desinfestação dos explantes (BONGA, 1982; ANDRADE et al., 2000). Uma outra limitação ao cultivo de espécies florestais *in vitro* é a ocorrência de compostos fenólicos, que podem modificar a composição do meio de cultivo e a absorção de metabólitos (THOMAS; RAVINDRA, 1997).

No entanto, atualmente a micropropagação de algumas espécies, como o eucalipto, tem sido bastante utilizada, especialmente para o rejuvenescimento

de clones, com o objetivo de formar e manter microjardins clonais que constituem a base para a produção de mudas pelo método da microestaquia (XAVIER; COMÉRIO, 1996). Segundo Mullins et al. (1997), os procedimentos convencionais de micropropagação em eucalipto ocorrem pela ativação de gemas axilares sob cultivo em meios de cultura. Porém, a propagação *in vitro* por organogênese de explantes foliares também possui a capacidade de regenerar grande número de plantas, com a vantagem de que pode ser automatizada.

Referências

- ALBUQUERQUE, C. C. A.; CAMARA, T. R.; MENEZES, M. WILLADINO, L.; MEUNIER, I.; ULISSES, C. Cultivo *in vitro* de ápices caulinares de abacaxizeiro para limpeza clonal em relação à fusariose. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 2, p. 363-366, 2000.
- ALMEIDA, W. A. B. de; MATOS, A. P. de; SOUZA, A. da S. Effects of benzylaminopurine (BAP) on *in vitro* proliferation of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.). **Acta Horticulturae**, n. 425, p. 245-242, 1997.
- ALMEIDA, W. A. B. de; SANTANA, G. S.; RODRIGUEZ, A. P. M.; COSTA, M. A. P. de C. Optimization of a protocol for the micropropagation of pineapple. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 296-300, 2002.
- ANDRADE, L. M. da C. O.; PASQUAL, M.; MACIEL, A. L. de R.; PEREIRA, A. R.; CAVALCANTE-ALVES, J. M. Cultura *in vitro* de embriões de *Coffea arabica*: influência de ANA e BAP. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 5, p. 1063-1070, 2001.
- ANDRADE, M. W. de; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S.; MELO, P. R. A. de. Micropropagação de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 174-180, 2000.
- ASSIS, M. Novas tecnologias na propagação de batata. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20, n. 197, p. 30-33, 1999.
- ASSIS, M. de; PAIVA, M.; ARMANI, O. C. Micropropagação de plantas: histórico de uma empresa comercial. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 21, n. 204, p. 124-126, 2000.
- BALDONEDO, A. N. Potencial das flores brasileiras e oportunidades para os produtores. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 227, p. 3, 2005.
- BONGA, J. M. Tissue culture techniques. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. **Tissue culture in forestry**. The Hague: Nijhoff, p. 4-35. 1982.
- BROWN, J.; BROWN, A. P.; DAVIS, J. B.; ERICKSON, D. Intergeneric hybridization between *Synopsis alba* and *Brassica napus*. **Euphytica**, v. 93, p. 163-168, 1997.
- CASTILLO, A. M.; CISTUÉ, L. Production of gynogenic haploids of *Hordeum vulgare* L. **Plant Cell Reports**, v. 12, p. 139-143, 1993.
- CAPELLADES-QUERALT, M.; BERUTO, A. M.; VANDERSCHAEGHE, A.; DEBERGH, P. C. Ornamentals. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.). **Micropropagation, technology and application**. London: Kluwer Academic, 1993. p. 215-229.

CAPUANO, G.; PICCIONI, E.; STANDARDI, A. Effect of different treatments on the conversion of M26 apple rootstock synthetic seeds obtained from encapsulated apical and axillary micropropagated buds. **Journal Horticultural Science Biotechnoly**, v. 73, p. 299-305, 1998.

CARNEIRO, V. T. de C.; CONROI, T.; BARROS, L. M. G.; MATSUMOTO, K. Protoplastos: culturas e aplicações. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPQ, 1998. v. 2. 864 p.

CARVALHO, S. A.; SANTOS, F. A.; MACHADO, M. A. Eliminação de vírus do complexo sorose dos citros por microenxertia associada a termoterapia. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 3, p. 306-308, 2002.

CID, L. P. B. Suspensão celular. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas**. Brasília, DF: ABCTP: EMBRAPA- CNPQ, 1998. p. 331-353.

COLLIN, H. A.; EDWARDS, S. **Plant Cell Culture**. New York: Springer-Verlag, 1998. 158 p.

DEBERGH, P. *In vitro* culture of ornamentals. In: VASIL, I. K.; THORPE, T. A. (Ed). **Plant Cell and Tissue Culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. p. 561-573.

DOMINGUES, E. D. **Cultura de tecidos visando o melhoramento genético de bananeira (*Musa ssp*) através da indução de mutações**. 1992. 119 f. Tese (Doutorado em Melhoramento Genético), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

DONATO, V. M. T. S.; ANDRADE, A. G. de; TAKAKI, G. M. de C.; MARIANO, R. de L. R.; MACIEL, G. A. Plantas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* com antibióticos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 134-141, 2005.

DURAND-GASSELIN, T.; LE GUEN, V.; KONAN, K.; DUVAL, Y. Plantation en Côte-d'Ivoire de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.), obtenus para culture in vitro. Premiers résultats. **Oléagineux**, v. 45, n. 1, 1-9, 1990.

ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v. 40, p. 427-433, 2004.

ETIENNE-BARRY, D.; BERTRAND, B.; VASQUEZ, N.; ETIENNE, H. Direct sowing of *Coffea arabica* somatic embryos mass-produced in a bioreactor and regeneration of plants. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 111-117, 1999.

FERREIRA, J. M. S.; LIMA, M. F.; SANTANA, D. L. Q.; MOURA, J. I. L.; SOUZA, L. A. Melhoramento genético do coqueiro. In: FERREIRA, J. M. S. F.; WARWICK, D. R. N.; SIQUEIRA, L. A. **A cultura do coqueiro no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa- SPI; Aracaju: Embrapa-CPATC, 1998. p. 189-254.

FUKUDA, W. M. G.; COSTA, I. R. S.; SILVA, S. de O. **Manejo e conservação de recursos genéticos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2005. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Circular técnica, 94). 2005. 4 p.

GAMA, M. I. C. S. Produção de plantas de batata-doce livres de vírus por termoterapia e cultura de meristemas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 13, p. 283-286, 1988.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. 2. ed. Exegetic: Edington, 1993, 547 p.

GROSSER, J. W.; GMITTER JUNIOR, F. G. Somatic hybridization of Citrus with wild relatives for germplasm enhancement and cultivar development. **HortScience**, Alexandria, v. 25, n. 2, p. 147-151, 1990.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI: Embrapa-CNPB, 1998. v. 2, p. 533-568.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.; CALDAS, L. S. (Ed.) **Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas**. Brasília, DF: ABCTP: EMBRAPA-CNPB, 1990. p. 99-169.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI: Embrapa -CNPB, 1998. v. 1, p. 183-260.

HANDA, L.; SAMPAIO, P. de T. B.; QUISEN, R. C. Cultura *in vitro* de embriões e de gemas de mudas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). **Acta Amazônica**, v. 35, n. 1, p. 29-33, 2005.

HARA, T.; SUGIURA, K.; FUKUI, H.; SONODA, Y. Utilization of ovary culture in nutritional study of fruit development of tomato plants. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 53, p. 453-459, 1989.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI: EMBRAPA-CNPB, 1998. v. 1, p. 371-393.

HUSSAIN, A.; JAISWAL, U.; JAISWAL, V. S. Synthetic seed: prospects and limitations. **Current Science**, v. 12, p. 1438-1443, 2000.

HASAN, S. M. Z.; TAKAGI, H. Alginate-coated nodal segments of yam (*Dioscoria* pp.) for germplasm exchange and distribution. IPGRI/FAO. **Plant Genetic Resources Newsletters**, v. 103, p. 32-35, 1995.

HELLIOT, B.; PANIS, B.; LOCICERO, A.; REYNIERS, K.; MUYLLEL, H.; VANDEWALLEL, M.; MICHELL, C.; SWENNENS, R.; LEPOIVREL, P. Development of *in vitro* techniques for elimination of virus diseases from *Musa*. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 560, p. 535-538, 2001.

KERBAUY, G. B. Clonagem de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 1, n. 1, p. 30-33, 1997.

KIDO, L. M. H. **Irradiação de gemas axilares, suspensão celular e protoplastos de bananeira cv. Maçã (*Musa* spp.), visando a seleção de mutantes resistentes à salinidade**. 2003. 136 f. Tese. Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

KISS, E.; KISS, J.; GYULA, I.; HESZKY, L. E. A novel method for rapid micropropagation of pineapple. **HortScience**, Alexandria, v. 30, n. 1, p. 127-129, 1995.

LAMEIRA, O. A.; LEMOS, O. F.; MENEZES, I. C. de; PINTO, J. E. B. P. **Cultura de tecidos (manual)**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000. 41 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 66).

LEDO, A. da S.; LAMEIRA, O. A.; BENBADIS, A. K.; MENEZES, I. de C.; LEDO, C. A. da S.; OLIVEIRA, M. S. P. de Cultura *in vitro* de embriões zigóticos de açaizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, 2002.

LEDO, A. da S.; LAMEIRA, O. A.; BENBADIS, A. K.; MENEZES, I. de C.; OLIVEIRA, M. S. P.; MEDEIROS FILHO, S. Somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Euterpe oleracea* Mart. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, 2001.

MALHOTRA, S. D. Biotechnology and sugarcane. **International Sugar Journal**, v. 97, p. 160-163, 1995.

MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; MCKEE, R. A. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. 344 p.

MARK, C.; HO, Y. W.; TON, Y. P.; IBRAHIM, R. Novaria – um nuevo mutante de banana inducido por radiación gama. **Infomusa**, v. 5, n. 1, p. 35-37, 1996.

MELO, B. de; PINTO, J. E. B. P.; LUZ, J. M. Q.; PEIXOTO, J. R.; JULIATTI, F. C. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões da guarirrobeira [*Syagrus oleracea* (MART.) BECC.]. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 6, p. 1301-1306, 2001.

MORRIS, J. B.; DUNN, S.; PINNOW, D. L.; HOPKING, M. S.; PITTMAN, R. N. Meristem culture for virus elimination and peanut interspecific hybrid preservation. **Crop Science**, v. 37, p. 591-594, 1997.

MULLINS, K. V. et al. Regeneration and transformation of *Eucalyptus camaldulensis*. **Plant Cell Reports**, v. 16, n. 11, p. 787-791, 1997.

MURASHIGE, T.; BITTERS, W. P.; RANGAN, T. S.; NAUER, E. M.; ROISTACHER, C. N.; HOLLIDAY, P. B. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free Citrus clones. **HortScience**, Alexandria, v. 7, p. 118-119, 1972.

NAVARRO, L.; ROISTACHER, C. N.; MURASHIGE, T. Improvement of shoot tip grafting *in vitro* for virus-free citrus. **American Society of Horticultural Science**, v. 100, n. 5, p. 471-479, 1975.

NG, S. Y. C. Production and distribution of virus-free yam (*Dioscorea rotundata* Poir.). **Acta Horticulturae**, v. 380, p. 324-328, 1994.

PASQUAL, M.; ALVES, G. P.; DUTRA, L. F.; CHAGAS, E. A.; RIBEIRO, L. de O. Desenvolvimento *in vitro* de embriões imaturos oriundos de tangerineira 'Poncã' x laranja 'Pêra' em diferentes fotoperíodos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 3, p. 535-540, 2003.

PASQUAL, M.; MOREIRA, M. A.; SOBRINHO, A. dos A. Biotecnologia aplicada à produção de mudas de abacaxi. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 19, n. 195, p. 20-23, 1998.

PATEL, A. V.; PUSCH, I.; MIX-WAGNER, G.; VORLOP, K. D. A novel encapsulation technique for the production of artificial seeds. **Plant Cell Reports**. v. 19, p. 868-874, 2000.

PEREIRA, C. D.; MELO, B. **Cultura de Tecidos Vegetais**. Uberlândia: UFU/ICIAG, 2004. Disponível em: <http://www.fruticultura.iciag.ufu.br/cult_tecidos.htm>. Acesso em: 15 maio 2006.

PEREIRA, J. E. S.; BIANCHI, V. J.; MARCHIORO, V. S.; BINSFELD, P. C. Biodiversidade e transgênicos. In: BINSFELD, P. C. (Org.). **Biossegurança em biotecnologia**. Rio de Janeiro: Interciência, 2004, p. 229-252.

PEREIRA, J. E. S.; COSTA, F. H. S.; ALVES, B. Jr.; GUEDES, R. da S. Respostas morfogênicas *in vitro* de inflorescências imaturas de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) influenciadas por fatores do meio de cultura. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS, BIODIESEL, 3., 2006, Varginha. **Biodiesel: evolução tecnológica e qualidade: anais**. Lavras: UFLA, 2006a. v. 1. p. 1-5, 1 CD-ROM.

PEREIRA, J. E. S.; COSTA, F. H. S.; MACIEL, S. A. Indução da embriogênese somática em genótipos de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) a partir de explantes foliares. In: : CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS, BIODIESEL, 3., 2006, Varginha. **Biodiesel: evolução tecnológica e qualidade: anais**. Lavras: UFLA, 2006a. v. 1. p. 1-5, 1 CD-ROM.

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. de L. Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 9, p. 1035-1043, 2003.

PEREIRA, J. E. S.; LEDO, A. S. **Biotecnologia: cultura de tecidos vegetais no Acre**. 2002. 1 folder.

PEREIRA, J. E. S.; MACIEL, T.; PEREIRA, M. A. A. Respostas *in vitro* de brotações de pupunheira em diferentes concentrações de BAP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 18., 2004, Florianópolis. **Tecnologia competitividade sustentabilidade: anais**. Florianópolis: SBF, 2004. 1 CD-ROM.

PEREIRA, J. E. S.; MACIEL, T.; OLIVEIRA, R. Embriogênese somática em pupunheira: alternativa para a multiplicação vegetativa de materiais selecionados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 3., 2005, Gramado. **Anais...** Passo Fundo: Embrapa Trigo: SBMP, 2005. 1 CD-ROM.

PEREIRA, J. E. S.; MACIEL, T. M. S.; COSTA, F. H. da S.; PEREIRA, M. A. A. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de murmuru (*Astrocaryum ulei*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 2, p. 251-256, 2006.

PEREIRA, M. A. A.; PEREIRA, J. E. S.; COSTA, F. H. S.; MACIEL, T. M. da S. Influência do ágar e amido de mandioca como solidificantes do meio no estabelecimento *in vitro* de abacaxizeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 18., 2004, Florianópolis. **Anais....** Florianópolis: SBF, 2004. 1 CD-ROM.

PICCIONI, E. Plantlets from encapsulated micropropagated buds of M.26 apple rootstock. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 47, p. 225-260, 1997.

PICCIONI, E.; STANDARDI, A. Encapsulation of micropropagated buds of six wood species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 42, p. 221-226, 1995.

PIERIK, R. L. M. Produccion de plantas libres de enfermedades. In: PIERIK, R. L. M. (Ed.) **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Ediciones Mundi-Pronsa, 1990. p. 169-180.

PRAXEDES, S. C.; SILVA JUNIOR, A. F. da; FIGUEIREDO, F. L. B.; FIGUEIREDO, M. de L.; CÂMARA, F. A. A.; OLIVEIRA, O. F. de. Estiolamento *in vitro* do abacaxizeiro pérola em presença de ANA e AIA [Pérola pineapple etiolation in presence of ANA and AIA]. **Caatinga**, Mossoró, v. 14, n. 1/2, p. 13-15, 2001.

RAO, P. S.; GANAPATHI, T. R.; SUPRASANNA, P.; BAPAT, V. A. Encapsulated shoot tips of banana: a new propagation and delivery systems. **InfoMusa**, v. 2, p. 4-5, 1993.

RAGHAVAN, V. One hundred years of zygotic embryo culture investigations. **In Vitro Cellular Development Biology**, v. 39, p. 437-442, 2003.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. **Genética na agropecuária**. Lavras: UFLA, 2000. 472 p.

RECH FILHO, A. **Biorreatores de imersão temporária e unidades encapsuláveis como ferramentas na consolidação de protocolos de micropropagação de bromélias**. 2004. 74 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RIBEIRO, L. de S.; PASQUAL, M.; MACIEL, A. L. de R.; CHAGAS, E. A.; DUTRA, L. F. Desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos de *Coffea arabica*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, p. 1479-1483, 2003. Edição Especial.

RIVAL, A.; BERTRAND, L.; BEULÉ, T.; COMBES, C.; TROUSLOT, P.; LASHERMES, P. Suitability of RAPD analysis for the detection of somaclonal variants in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Breeding**, v. 117, 73-76, 1998.

ROCHA, H. S. **Luz e sacarose na micropropagação da bananeira "Prata Anã": alterações morfoanatômicas**. 2005. 98 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ROH, M. S.; GRIESBACH, R. J.; LAWSON, R. H.; GROSS, K. C. Production and identification of interspecific hybrids of *Lilium longiflorum* and *L. elegans*. **Acta Horticulturae**, n. 414, p. 93-97, 1996.

SÁ, M. E. L. de; CANÇADO, G. M. de A.; SOUZA, C. M. de. Cultivo de plantas *in vitro* e suas aplicações. In: Biotecnologia. **Informe Agropecuário**, v. 21, n. 204, p. 116-123, 2000.

- SANDOVAL, E. Y.; GUERRA, M. P. Encapsulamento de microbrotos de bananeira cv. Grand Naine. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., 2002, Belém, PA. **Os novos desafios da fruticultura brasileira: anais**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2002. 1 CD-ROM.
- SILVA, A. B. **Biorreator e luz natural na micropropagação do abacaxizeiro**. 2006. 132 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia), Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- SILVA, S. de O.; GASPAROTTO, L.; MATOS, A. P. de; CORDEIRO, Z. J. M.; FERREIRA, C. F.; RAMOS, M. M.; JESUS, O. N. de. **Programa de melhoramento de bananeira no Brasil - resultados recentes**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. 1 CD-ROM. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Documentos, 123).
- SILVA, V. dos S. **Regeneração *in vitro* de embriões de *Cocos nucifera* L.** 2002. 78 f. Dissertação. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- SOUZA, F. V. D.; CABRAL, J. R. S.; REINHARDT, D. H.; SOARES, T. L.; CARDOSO, J. L.; BENJAMIN, D. A. Slow-Growth Conditions for the *In Vitro* Conservation of Pineapple Germplasm. *Acta Horticulturae*, v. 702, 2006.
- SOUZA, F. V. D. **Multiplicação *in vitro* da bananeira triplóide (AAA) 'Caipira' e instabilidade mitótica das plantas produzidas**. 1994. 73 f. Dissertação, Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas.
- STANDARDI, A.; PICCIONI, E. Recent perspectives on synthetic seed technology using nonembryogenic *in vitro*-derived explants. *Internacional Journal of Plant Science*, v. 159, n. 6, p. 968-978, 1998.
- STROSSE H.; DOMERGUE, R.; PANIS, B.; ESCALANT, J. V.; CÔTE, F. Banana and plantain embryogenic cell suspensions. VÉZINA, A.; PICQ, C. (Ed.). **Banana and plantain embryogenic cell suspensions**. Montpellier, França: Inibap, 2003. 31 p. il. (Inibap. Technical Guidelines, 8).
- TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: IAC, 1998. 72 p. (IAC, Boletim Técnico, 174).
- THOMAS, P., RAVINDRA, M. B. Shoot tip culture in mango: influence of medium, genotype, explant factors, season and decontamination treatments on phenolic exudation, explant survival and axenic culture establishment. *Journal of Horticulture Science*, Bangalore, v. 72, n. 5, p. 713-722, 1997.
- TULMANN-NETO, A.; MENDES, B. M. J.; ANDO, A. Indução e uso de mutação "in vitro". In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas**. Brasília, DF: ABCTP: EMBRAPA-CNPq, 1990. p. 341-378.
- VESCO, L. L. D.; PESCADOR, R.; BELO, A.; FEUSER, S.; OLIVEIRA, E. N. de; BRANCHER, A.; ZAFFARI, G. R. NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Qualidade genotípica de mudas e performance a campo de plantas micropropagadas de abacaxizeiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Cruz das Almas, v. 22, n. 1, p. 80-85, 2000.
- VIEIRA, M. L. C. Conservação de germoplasma *in vitro*. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, ano 3, n. 14, p. 18-20, 2000.

XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Microestaquia: uma maximização da micropropagação de *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, v. 20, n. 1, p. 9-16, 1996.

WILLIAMS, E. S.; MAHESWARAN, B. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, v. 57, p. 443-462, 1986.