

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2010.08.06</b>	(73) Titular(es):
(30) Prioridade(s):	<b>UNIVERSIDADE DE ÉVORA</b>
(43) Data de publicação do pedido: <b>2012.02.06</b>	<b>LARGO DOS COLEGIAIS, Nº 2</b>
	<b>7000-803 ÉVORA</b> <b>PT</b>
	(72) Inventor(es):
	<b>MÁRIO RUI DA COSTA BASÍLIO E CASTRO</b> <b>PT</b>
	<b>CARLA APARECIDA RAGONEZI GOMES LOPES</b> <b>PT</b>
	<b>PAULO GUILHERME LEANDRO DE OLIVEIRA</b> <b>PT</b>
	<b>MARIA AMELY ZAVATTIERI</b> <b>PT</b>
	(74) Mandatário:

(54) Epígrafe: **SISTEMA E MÉTODO DE CULTURA DE PLANTAS IN VITRO PARA ANÁLISE DE METABOLITOS LIBERTADOS PELO SISTEMA RADICULAR**

(57) Resumo: O PRESENTE INVENTO DIZ RESPEITO AO DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA E MÉTODO DE CULTURA IN VITRO (1,2) CONSTITUÍDO POR DUAS FASES, UMA SÓLIDA (3,4,5) E UMA LÍQUIDA (6), A PRIMEIRA PARA SUPORTE DA PLANTA (7,8) E A SEGUNDA PARA PERMITIR A ANÁLISE DO MEIO CIRCUNDANTE DAS RAÍZES (9). ESTE SISTEMA FOI DESENHADO PARA PERMITIR UMA FÁCIL EXTRACÇÃO DOS COMPOSTOS METABÓLICOS LIBERTADOS/DIFUNDIDOS NA FASE LÍQUIDA DURANTE O CRESCIMENTO RADICULAR, DE FORMA A FACILITAR O SEU POSTERIOR PROCESSAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA. TENDO EM CONTA QUE UM CRESCIMENTO RADICULAR CORRECTO É UM DOS FACTORES FUNDAMENTAIS PARA O POSTERIOR FORTALECIMENTO E ESTABELECIMENTO DAS PLANTAS NO CAMPO, A DETERMINAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS BIOQUÍMICAS RESPONSÁVEIS PELO MELHOR DESEMPENHO DA PLANTA PODERÁ CONDUZIR À SUA SÍNTESE ARTIFICIAL E IMPLEMENTAÇÃO COMO ADITIVO PARA ADUBOS ORGÂNICOS. TRATANDO-SE DE UM SISTEMA FECHADO COM VARIÁVEIS CONHECIDAS, ESTE PODERÁ SER APLICADO EM ENSAIOS COM PESTICIDAS, HERBICIDAS E OUTROS PRODUTOS SIMILARES.

## Resumo

Sistema e método de cultura de plantas *in vitro* para análise de metabolitos libertados pelo sistema radicular

O presente invento diz respeito ao desenvolvimento de um sistema e método de cultura *in vitro* (1,2) constituído por duas fases, uma sólida (3,4,5) e uma líquida (6), a primeira para suporte da planta (7,8) e a segunda para permitir a análise do meio circundante das raízes (9). Este sistema foi desenhado para permitir uma fácil extracção dos compostos metabólicos libertados/difundidos na fase líquida durante o crescimento radicular, de forma a facilitar o seu posterior processamento e caracterização bioquímica. Tendo em conta que um crescimento radicular correcto é um dos factores fundamentais para o posterior fortalecimento e estabelecimento das plantas no campo, a determinação das substâncias bioquímicas responsáveis pelo melhor desempenho da planta poderá conduzir à sua síntese artificial e implementação como aditivo para adubos orgânicos. Tratando-se de um sistema fechado com variáveis conhecidas, este poderá ser aplicado em ensaios com pesticidas, herbicidas e outros produtos similares.

## Descrição

Sistema e método de cultura de plantas in vitro para análise de metabolitos libertados pelo sistema radicular.

### Domínio Técnico da invenção

A presente invenção tem como base um sistema de cultura de plantas in vitro através da aplicação de um método de biotecnologia vegetal, que visa a fácil obtenção de metabolitos secundários libertados pelo sistema radicular. Entende-se no âmbito desta invenção que o sistema radicular poderá ser compreendido por caule ou raiz dado que ambos poderão ser responsáveis pela nutrição e sustentação da planta.

### Estado da Técnica

Meios sólidos baseados em agentes gelificantes são o suporte de cultura mais utilizado a nível mundial para plantas in vitro. Existem actualmente centenas de formulações químicas diferentes, especificamente desenvolvidas de acordo com a planta ou com o objectivo do trabalho. No entanto, na regeneração a partir de rebentos micropropagados in vitro, a organogénese das raízes constitui o principal obstáculo à realização desta técnica em muitas espécies de plantas, especialmente gimnospéricas. A produção inicial de raízes é ineficiente (poucas plantas enraizadas) ou, pelo menos, não é seguida dum desenvolvimento adequado a uma posterior passagem das plantas para aclimação em estufas. Por isso a investigação sobre novas formulações químicas que permitam ultrapassar estas dificuldades assume grande importância.

Sabe-se que o condicionamento das raízes da planta em meio de cultura é o principal responsável pelo posterior crescimento radicular, em parte devido ao stress imposto à planta, quer

por excesso/défice de nutrientes, ou o gradiente osmótico, ou a presença de hormonas ou de outros reguladores de crescimento. No entanto, ficam ainda por compreender quais as respostas metabólicas dadas pela planta quando submetida aos condicionamentos acima descritos.

Em alguns casos, demonstra-se que este bloqueio do desenvolvimento radicular pode ser ultrapassado com a biotização da cultura, isto é, pela introdução na cultura dum parceiro microbiano cuja actividade promove uma alteração no comportamento da planta (Nowak, 1998). No caso do pinheiro manso (*Pinus pinea* L.), o estímulo necessário para o recomeço do crescimento radicular nas culturas em agar-agar foi conseguido pela introdução de inóculos de fungos derivados de ectomicorrizas desta espécie (Oliveira et al, 2003).

Contudo, em todos os casos de sucesso no enraizamento de coníferas *in vitro*, o conhecimento sobre os sinais envolvidos é ainda muito limitado (Ragonezzi et al., 2010). No sentido de esclarecer a composição química do meio onde se encontram as raízes, tanto durante o seu normal crescimento como em biotização, são necessários estudos que dependem da análise do meio onde são realizadas as culturas e com níveis de sensibilidade muito elevados. A verdade, porém, é que o uso de agentes gelificantes, como por exemplo o Phytigel ou o Agar-Agar, traduz-se num obstáculo à extracção desses componentes do meio, especialmente quando estes se encontram em concentrações muito baixas, já que os métodos de extracção para estes agentes gelificantes implicam elevadas temperaturas que poderão degradar os mesmos compostos que pretendemos extrair. O recurso unicamente a um meio líquido sem qualquer suporte para a planta também se apresenta como uma solução inviável, dado que a planta tende a afundar-se. A utilização de uma plataforma de papel de filtro pode parecer uma solução para um estudo num curto espaço de tempo, mas

após totalmente embebido, induz a planta a um stress hídrico que conduz invariavelmente a alterações morfológicas por hiperhidricidade ou vitrificação (Debergh 1988, Debergh et al. 1992).

O sistema apresentado nesta patente, substituindo o meio de cultura habitualmente utilizado (com agente gelificante) por uma combinação de meio de cultura líquido e uma plataforma de sustentação da planta, simultaneamente facilita a tarefa de extracção de metabolitos envolvendo as raízes, e assegura as funções de sustentação da planta, deste modo ultrapassando as dificuldades até hoje existentes.

O recurso a duas fases de meios de cultura não é uma ideia nova na biotecnologia de plantas. Existem actualmente diversas patentes que referem o recurso a uma fase líquida e uma fase sólida na cultura de plantas micropropagadas, no entanto, o seu uso é intercalado, ou seja, não ocorre no mesmo estágio da planta (ver patentes: WO0120972, KR20020029340) estando em muito dos casos limitado a fases celulares e não propriamente a plantas completas. Quanto ao recurso de um sistema flutuante com a finalidade de sustentar a planta, a patente WO8604919 descreve o recurso a bolas de polipropileno como base de sustentação, mas a sua utilização torna-se limitativa no sentido em que ou é utilizada em um sistema de tubo de ensaio para culturas celulares, ou num aparato mecânico para plantas completas que poderá limitar a exequibilidade em larga escala ao nível financeiro.

O sistema e método apresentado nesta patente é de fácil exequibilidade não requerendo materiais ou equipamentos para além do que é utilizado rotineiramente em laboratórios de biotecnologia.

## Descrição detalhada do invento

1. Este invento consiste essencialmente num sistema de cultura para plantas micropropagadas, com tamanho da parte aérea compreendido entre 2 e 5 cm, constituído por duas fases, uma fase líquida e outra sólida, doravante chamado de dupla fase. As duas fases podem ou não conter igual composição de nutrientes.
2. Em cada uma das fases o meio de cultura é constituído por uma mistura de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, hidratos de carbono e eventualmente outros compostos, respeitando uma formulação química específica da planta com que se pretende trabalhar. Recomenda-se, que o pH do meio de cultura da fase sólida seja superior a 5,8 e inferior a 6,5 de forma a permitir uma boa consolidação do agente gelificante sem prejudicar o normal desenvolvimento da planta.
3. Utiliza-se um substrato flutuante, de textura granular de baixa densidade, autoclavável e inócuo; entende-se inócuo como não libertando qualquer tipo de substância que possa interferir, nem com a fisiologia da planta nem com a composição química da fase líquida. Este substrato contribui ainda para conferir maior rigidez à fase sólida, que constitui uma plataforma de suporte à planta.
4. Na fase sólida utiliza-se meio de cultura gelificado, misturado com substrato flutuante. Deve-se preparar a fase sólida no fundo do próprio frasco onde se realizará a cultura, que não deverá ultrapassar 6 cm de diâmetro. Pelas características do substrato de baixa densidade,

este procedimento preliminar leva a que este se situe junto à superfície superior ainda antes da gelificação. A fase sólida deve então ser invertida com a ajuda de um instrumento do tipo espátula metálica devidamente esterilizado. Isso permitirá colocar a planta sobre a superfície oposta ao substrato flutuante.

5. O meio inferior, ou fase líquida, é composto por um meio de cultura líquido que apresenta a função de nutrição da planta e zona de difusão de metabolitos em contacto com o sistema radicular. A fase líquida é vertida sobre a fase sólida e deve passar espontaneamente para baixo desta última. Assim, o substrato flutuante fica directamente em contacto com a fase líquida.

6. Com um objecto perfurante esterilizado e aquecido, até atingir cerca de 200°C, faz-se uma pequena perfuração no centro da fase sólida para permitir a inserção do caule ou raiz da planta. A mesma ficará assim com o sistema radicular mergulhado na fase líquida e a parte aérea acima da fase sólida.

#### Modo de realização da invenção

No texto que segue, os números entre parêntesis dizem respeito à legenda das figuras 1 e 2.

Todo o método deve realizar-se de modo a assegurar a assépsia das culturas. O substrato flutuante (4) é esterilizado por autoclavagem à temperatura de 121°C já dentro do frasco (2) escolhido para a execução do método. De seguida, o meio líquido e sólido (este último com o agente gelificante), são autoclavados separadamente. Uma vez devidamente esterilizados, todos os materiais são transportados para uma

câmara de fluxo laminar, onde se procede ao seu manuseamento em ambiente estéril. Deve-se verter a solução de meio sólido para dentro do frasco (2) e verificar que o substrato ascende naturalmente no meio, ocupando a posição superior da fase sólida (3). Deixa-se solidificar entre 1 a 3 horas, com o frasco (2) devidamente selado, de forma a garantir que a matriz sólida não tem fissuras. A Figura 1 esquematiza o aspecto final da fase sólida (3) em que dentro do frasco (2) devidamente selado com a respectiva tampa (1), o substrato flutuante (4) se encontra sobre o meio de cultura gelificado (5).

O próximo passo consiste na inversão da fase sólida (3). Segurando o frasco obliquamente, insere-se no rebordo da fase sólida (3) um instrumento do tipo espátula metálica devidamente esterilizado, rodando o frasco para descolá-la do vidro. Quando tal acontece, a fase sólida (3) tomba suavemente sobre a espátula, permitindo recolocá-la no fundo do frasco, mas invertida. O substrato flutuante (4) deverá estar agora em contacto com o fundo do frasco. Esta inversão da fase sólida (3) vai permitir uma separação eficaz entre a superfície em contacto com o ar e a fase líquida (6); assim, permite-se assegurar um meio de crescimento adequado a eventuais organismos em caso de biotização da cultura, que seja diferente do da fase líquida (6), além de que se melhora a eventual distinção entre as composições químicas das duas fases, e também a flutuabilidade da fase sólida (3).

A fase seguinte consiste em verter o meio líquido sobre a fase sólida. O meio líquido irá naturalmente para baixo da fase sólida (3), devido às propriedades flutuantes do substrato. É conveniente tentar remover o ar aprisionado entre a fase líquida (6) e a fase sólida (3), levantando ligeiramente o bordo da fase sólida (3) com a ajuda da espátula.

Para a colocação da planta no respectivo frasco (2), é necessário produzir, com um objecto perfurante esterilizado e aquecido, uma abertura na fase sólida (3). Através desta abertura, deve ser passado, o caule ou a raiz (9) para que o mesmo esteja em contacto com o meio de nutrição, a fase líquida (6). A parte superior do caule (8) deverá ficar presa na fase sólida (3) permitindo que a parte aérea da planta (7) não entre em contacto com a fase líquida (6) deste método. A Figura 2 representa assim o esquema geral deste método.

A etapa final do novo método objecto da presente invenção envolve ainda que, no final do tempo pretendido de cultura, se transporte o sistema (frasco, fase líquido, fase sólido e planta), para uma câmara de fluxo laminar, onde se procede à inserção de um instrumento do tipo espátula metálica devidamente esterilizado no rebordo da fase sólida (3), segurando-a juntamente com a planta enquanto se verte a fase líquida (6) para um recipiente de recolha. Esta fase líquida (6) pode por fim ser analisada bioquimicamente ou em alternativa, conservada a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior análise.

Este sistema permite ainda que seja possível renovar a fase líquida para eventual continuação da cultura e estudos bioquímicos que envolvam uma componente temporal, por exemplo uma análise de 48 em 48 horas dos compostos libertados pelo sistema radicular da planta.

A fase sólida (3) tem durabilidade até 25 dias após a sua formação, permitindo que uma panóplia de testes possa ser realizada sem a sua renovação, desde que em condições totalmente assépticas. Para tal, deve retirar-se a fase líquida, utilizando a técnica já descrita acima, e com uma pipeta volumétrica devidamente esterilizada, insere-se cuidadosamente uma nova fase líquida aproveitando a zona de contacto entre a fase sólida e o frasco.

A eventual biotização da cultura poderá programar-se seguindo

o mesmo método, colocando-se o inóculo sobre a superfície da fase sólida (3) em contacto com o ar. Desta forma, o inóculo tem uma superfície de sustentação e nutrição independente, e caso seja necessário, uma formulação específica, que deve ser ajustada em função da espécie do inóculo.

#### Exemplo

Para a confirmação da exequibilidade deste método, foram utilizados frascos de vidro específicos para cultura de tecidos vegetais (Sigma, ref<sup>a</sup> V8630/B8648) com 6 cm de diâmetro de base, adequados à cultura de rebentos enraizados de *Pinus pinea* (pinheiro-manso), com quatro meses de regeneração a partir de cotilédones. Em cada frasco, foram colocados 0,9 g de perlite (Europerl) e adicionados 15 ml de meio sólido WPM (Lloyd and McCown, 1981). Após arrefecimento da fase sólida, esta foi invertida, e adicionaram-se 35 ml de meio líquido WPM sem hidratos de carbono, ficando a perlite directamente em contacto com a fase líquida. Foi realizado um pequeno orifício no centro da fase sólida, com a ajuda de uma pinça esterilizada e aquecida e procedeu-se à colocação do rebento enraizado de *Pinus pinea*.

#### Vantagens e limitações

Este invento distingue-se por:

1. Permitir uma mais fácil e rápida extracção do meio de cultura líquido para análise dos componentes químicos libertados pelo sistema radicular, sem a interferência de materiais sólidos que tendem a dificultar a sua purificação.
2. Permitir a utilização de diferentes espécies de plantas devido à possibilidade de ajustar a composição química da fase líquida em função dos requisitos específicos do meio de crescimento de cada planta.

3. Apresentar a necessária versatilidade à introdução de diferentes parceiros de biotização, nomeadamente pela formulação química da fase sólida. No entanto, deverá ter-se em consideração que diferentes formulações químicas dos meios poderão implicar um reajuste da quantidade de agente gelificante ou substrato flutuante na fase sólida, pelo que essas variações devem ser testadas previamente.
4. Apresentar uma grande versatilidade no que respeita à selecção de materiais, sejam eles o agente gelificante, o substrato flutuante ou os recipientes a utilizar. Deve-se ter em conta que o aumento do diâmetro do frasco implica uma maior fragilidade da fase sólida, podendo comprometer todo um ensaio. É recomendável utilizar frascos com diâmetro até 6 cm, idênticos aos referidos no exemplo, para os quais foram realizados diversos testes de consistência da técnica. A utilização de frascos de maior diâmetro acarreta a utilização de volumes maiores de fase sólida e líquida, pelo menos na proporção da área do fundo do frasco.
5. Ser fácil de implementar, requerendo componentes disponíveis rotineiramente num laboratório de Biotecnologia de Plantas, e não necessitando de infraestruturas especiais.
6. Ser fácil de executar. Mesmo a inversão da fase sólida é um passo que se domina rapidamente após alguma prática. As dificuldades técnicas prendem-se unicamente com a eventual quebra da fase sólida durante a inversão. Estima-se, com os frascos referidos no exemplo, que quando muito 1% das fases sólidas se partem aquando do seu manuseamento com a espátula. Se os valores assumirem proporções superiores, é recomendável verificar se os valores de pH se encontram no intervalo entre 5,8 e 6,5.

7. Permitir que seja possível renovar a fase líquida para eventual continuação da cultura e estudos bioquímicos que envolvam uma componente temporal.

#### Aplicação Industrial

Este sistema permite a fácil extracção para estudo de metabolitos secundários libertados pelo sistema radicular das plantas aquando do seu normal desenvolvimento ou como resultado das interacções com agentes biotizantes. Sabendo que um bom desenvolvimento radicular é fundamental para o fortalecimento e o estabelecimento das plantas no campo, a determinação de quais as substâncias responsáveis pelo melhor desempenho da planta poderá conduzir à sua síntese artificial e implementação como aditivo para adubos orgânicos. Estes adubos podem ser utilizados para ajudar a planta a ter acesso aos nutrientes, e ao mesmo tempo promover o seu crescimento radicular e o fortalecimento das suas defesas contra vulgares ataques biológicos. Tratando-se de um sistema fechado com variáveis conhecidas, o sistema apresentado poderá ser aplicado em ensaios com pesticidas, herbicidas e outros produtos similares.

#### Descrição das Figuras

Figura 1: Esquema ilustrativo do aspecto final da preparação da fase sólida do sistema num frasco de cultura de plantas in vitro.

Figura 2: Esquema ilustrativo do aspecto final do método com inclusão de planta enraizada.

### Legenda das Figuras

1	Tampa
2	Frasco
3	Fase sólida
4	Substrato flutuante
5	Meio de cultura gelificado
6	Fase líquida
7	Parte aérea da planta
8	Caule
9	Raízes

### Bibliografia

Debergh PC (1988) Micropropagation of woody species: state of the art on in vitro aspects. Acta Hort 227:287-295

Debergh PC, Aitken-Christie J, Cohen D, Grout B, von Arnold S, Zimmerman R, Ziv M (1992) Reconsideration of the term "vitrification" as used in micropropagation. Plant Cell Tissue Organ', Cult 30: 135-140

Lloyd G., McCown B. (1981). Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by the use of shoot tip culture. Proc Plant Prop Soc **30**:421-427.

Nowak J. (1998) Benefits of in vitro 'biotization' of plant tissue cultures with microbial inoculants. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. **34**, 122-130.

Oliveira P, Barriga J, Cavaleiro C, Peixe A, Potes AZ, (2003). Sustained in vitro root development obtained in *Pinus pinea* inoculated with ectomycorrhizal fungi. Forestry **76**, 579-587.

Ragonezi C, Castro MR, Lima M, Klymaszewska K, de Oliveira P, Zavattieri MA, (2010). "Rooting conifers". REVIEW ARTICLE.

In: Trees, Springer. In press.

Patente KR20020029340 - Method for somatic embryogenesis and mass propagation from embryogenic cell cultures of *Eleutherococcus chiisanensis*.

Patente WO0120972 - Method for maturation of conifer somatic embryos.

Patente WO8604919 - Method and device for the in vitro culture of plant cells and organ's, as well as for the micropropagation and regeneration of complete plants.

Évora, 6 de Agosto de 2010

## Reivindicações

1. Sistema de cultura de plantas *in vitro* para análise de metabolitos libertados pelo sistema radicular caracterizado por compreender em simultâneo dois meios de cultura, um sólido e o outro líquido, dispostos em camada denominado dupla-fase.
2. Sistema de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por compreender uma fase sólida (3) composta por um meio de cultura gelificado (5) e um substrato flutuante (4).
3. Sistema de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por compreender uma fase líquida (6) composta por meio de cultura líquido.
4. Sistema de acordo com as reivindicações 1, caracterizado por uma livre formulação química das duas fases, líquida e sólida, para se adaptarem às necessidades específicas das plantas.
5. Método de cultura de plantas *in vitro* para análise de metabolitos libertados pelo sistema radicular, caracterizado por um sistema de dupla-fase que compreende as seguintes etapas:
  - a. Preparação dos meios de cultura, sólido e líquido;
  - b. Preparação da fase sólida (3), misturando o meio de cultura sólido com um substrato flutuante (4) num frasco (2) para cultura de plantas *in vitro*;
  - c. Inversão da fase sólida (3);
  - d. Verter o meio de cultura líquido sobre a fase sólida (3), originando a fase líquida (6);
  - e. Perfuração da fase sólida (3) para inserção do sistema radicular (9) e do caule (8) da planta;
  - f. Cultura da planta;
  - g. Extração da fase líquida (6) para posterior análise.
6. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por reutilização da fase sólida (3) com a mesma planta (7, 8 e 9), por introdução de uma nova fase líquida (6) para estudos e análises com componente temporal.

7. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por reutilização da fase sólida (3) por introdução de uma nova fase líquida (6) e de nova planta (7, 8 e 9).

Évora, 08 de Outubro de 2010

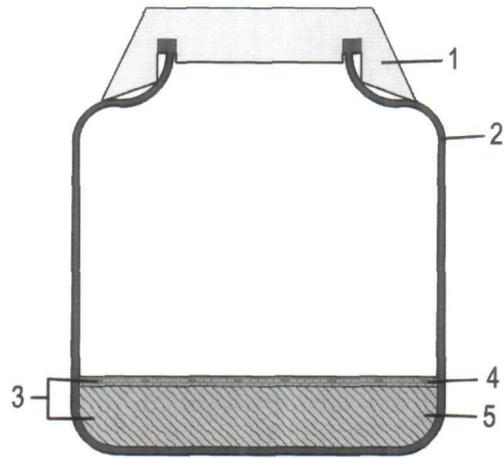


Figura 1

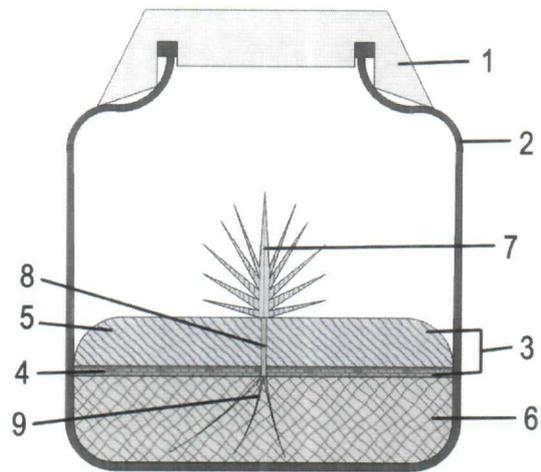


Figura 2