

Cultura *in vitro* e micropropagação



Sumário

A cultura de células, tecidos e órgão vegetais: conceitos e aplicações

Micropropagação

Fases da micropropagação

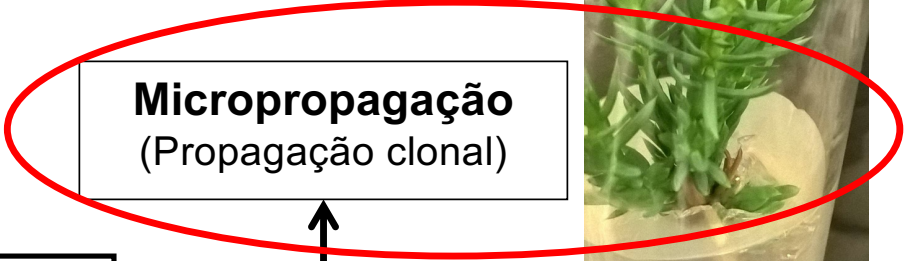
Sistemas de multiplicação: meios agarizados e biorreatores

O Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior (CBPBI)



Cultura de CTO Vegetais

Conservação de germoplasma



Micropropagação (Propagação clonal)

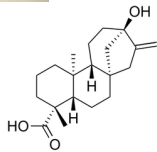
Estudos aplicados



Melhoramento genético
(fixação de genótipos elite)

- Resistência a doenças, salinidade, herbicidas, ...
- Eliminação de vírus (cultura de meristemas/termoterapia).
- Haploides (cultura de anteras).
- Protoplastos e hibridação somática.
- Variabilidade genética somaclonal.
- Plantas transgênicas.

Metabolitos secundários
Biossíntese/produção de metabolitos secundários



Princípios

Biológicos

- Possibilidade de reduzir um organismo multicelular aos seus órgãos, tecidos ou células e sua utilização como unidades biológicas isoladas.
- Capacidade de totipotência das células vegetais

Químicos e Físicos

- Formulação de meios nutritivos que permitem suprir as necessidades metabólicas de acordo com os modelos de diferenciação/crescimento definidos.
- Condições físicas para manutenção, crescimento e diferenciação.

Marcos históricos na CTV

1838_Schleiden e Schwann levantaram a hipótese de que toda célula tinha capacidade de gerar um indivíduo.

1902_Haberlandt tentou demonstrar a totipotencialidade das células das plantas, a partir de material adulto, porém não conseguiu divisão celular.

1904_Hanning foi o primeiro a cultivar embriões imaturos de crucíferas *in vitro* com sucesso.

1934_White manteve o crescimento de ápices de raízes de tomate, em meio líquido, por um período ilimitado.

Neste mesmo ano, Thimann identifica a primeira hormona, a auxina, ácido indol-acético.

1939_Gautheret e Nobécourt estabeleceram um protocolo para a manutenção de cultura de calo de cenoura.

1952_Morel e Martin recuperaram plantas de dália livres de Vírus do Mosaico por cultura de ápices caulinares.

Marcos históricos na CTV

1954_Muir et al. obtiveram a primeira planta, a partir de uma célula isolada.

1955_Miller et al. Identificaram a primeira citocinina, a cinetina.

1960_Morel recuperou cultivares de orquídeas livres de vírus, mediante cultura de meristemas.

1962_Murashige e Skoog elaboraram o meio de cultura conhecido universalmente, denominado meio MS.

1974_Reinhard iniciou estudos sobre a biotransformação de tecidos vegetais.

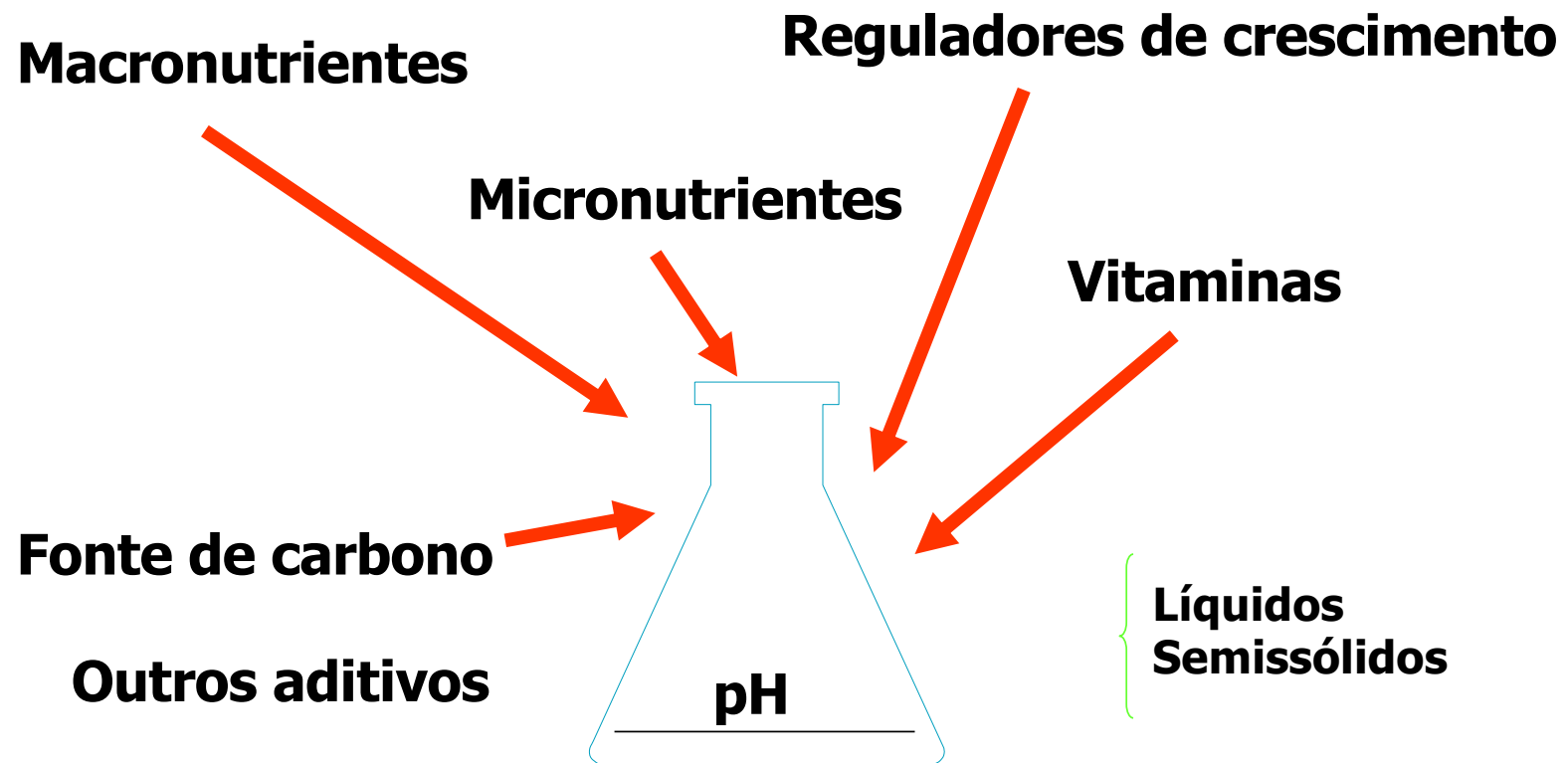
1985_Horsch et al. obtiveram a infecção e a transformação genética de disco foliares de tabaco com *Agrobacterium*, bem como a regeneração das plantas transformadas.

Meios de cultura

Preparados líquidos, sólidos ou semissólidos formulados especificamente para o estabelecimento, crescimento e diferenciação de órgãos, tecidos ou células, bem como para o seu transporte e conservação.



Meios de cultura



Meios de cultura

Etapas na preparação e uso de um meio de cultura:

1. Formulação
2. Distribuição
3. Esterilização
4. Inoculação de material biológico
5. Incubação / Crescimento / Diferenciação do material vegetal

1. Formulação

Definição dos diferentes constituintes do meio na respetiva concentração (mg L^{-1} ; $\mu\text{M L}^{-1}$)

Com base na literatura

De carácter de investigação

Dissolução em líquido (água, bases ou ácidos)

Meios de cultura

3. Esterilização

Eliminação de toda e qualquer forma e atividade de microrganismo existente no meio e seu recipiente

Agentes de esterilização:

Físicos (temperatura, radiação e filtração)

Meios de cultura

Temperatura: calor húmido – autoclave (121°C; 1 atm; 15-25 min)
(meios)



calor seco - estufa (180°C; 2-3 h)
(utensílios)



Meios de cultura

4. Inoculação

Estabelecimento do material biológico em contacto com o meio de cultura

Preparação e desinfeção do material biológico (agentes químicos, HipNa e Cl_2Hg)
Manipulação em condições asséticas (câmaras de fluxo laminar)



Meios de cultura

5. Incubação/Crescimento/Diferenciação

Processos de crescimento e diferenciação do material biológico

Condições físicas de cultura: temperatura, luz (fotoperíodo e intensidade)

Outros fatores ambientais (gases)



MICROPROPAGAÇÃO

Propagação *in vitro*

Entende-se por micropropagação ou propagação *in vitro*, a propagação de plantas em meios de cultura de formulação definida, mantidas em ambiente artificial controlado, utilizando contentores de plástico ou vidro, com manipulação em condições assépticas.

IAPTC (1985). Usage of Vertebrate, Invertebrate and Plant Cell, Tissue and Organ Culture Terminology. Newsletter, 45:15-22.

Vantagens

- ✓ Propagação massal de plantas geneticamente idênticas (clonagem);
- ✓ Produção de plantas durante todo o ano;
- ✓ Obtenção de plantas isentas de doenças e pragas;
- ✓ Rápida multiplicação de plantas para lançamento no mercado.
- ✓ Obtenção de grande número de plantas por m² com economia de espaço.
- ✓ Ferramenta importante para a conservação e melhoramento genético de plantas.

Desvantagens

- ✓ Dificuldade em encontrar formulação nutritiva adequada para a espécie desejada;
- ✓ Exige formação de pessoal especializado;
- ✓ Laboratório especializado com custos elevados;
- ✓ Plantas lenhosas, em geral, apresentam certas dificuldades para regeneração *in vitro*;
- ✓ Redução da base genética (clonagem).

MICROPROPAGAÇÃO

Explante



órgão
tecido
célula

condições assépticas

controlo de factores

nutritivos
hormonais
químicos
físicos

Planta



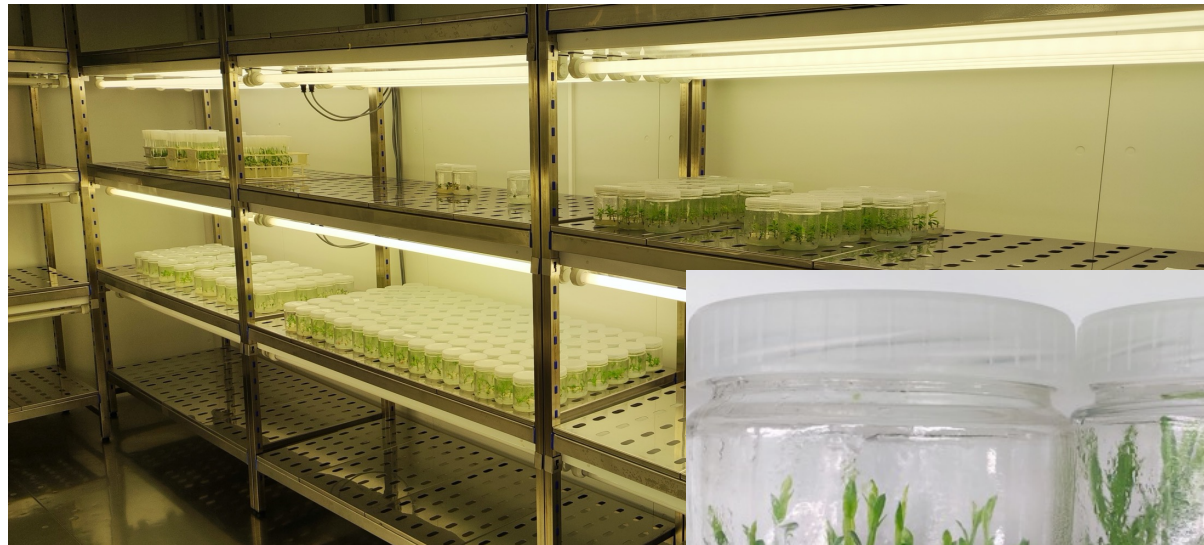
Condições de desenvolvimento *in vitro*

Fonte de carbono (sacarose)

Humidade elevada (100%)

Fraca intensidade luminosa ($50/150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

Dificuldade nas trocas gasosas (recipientes fechados)



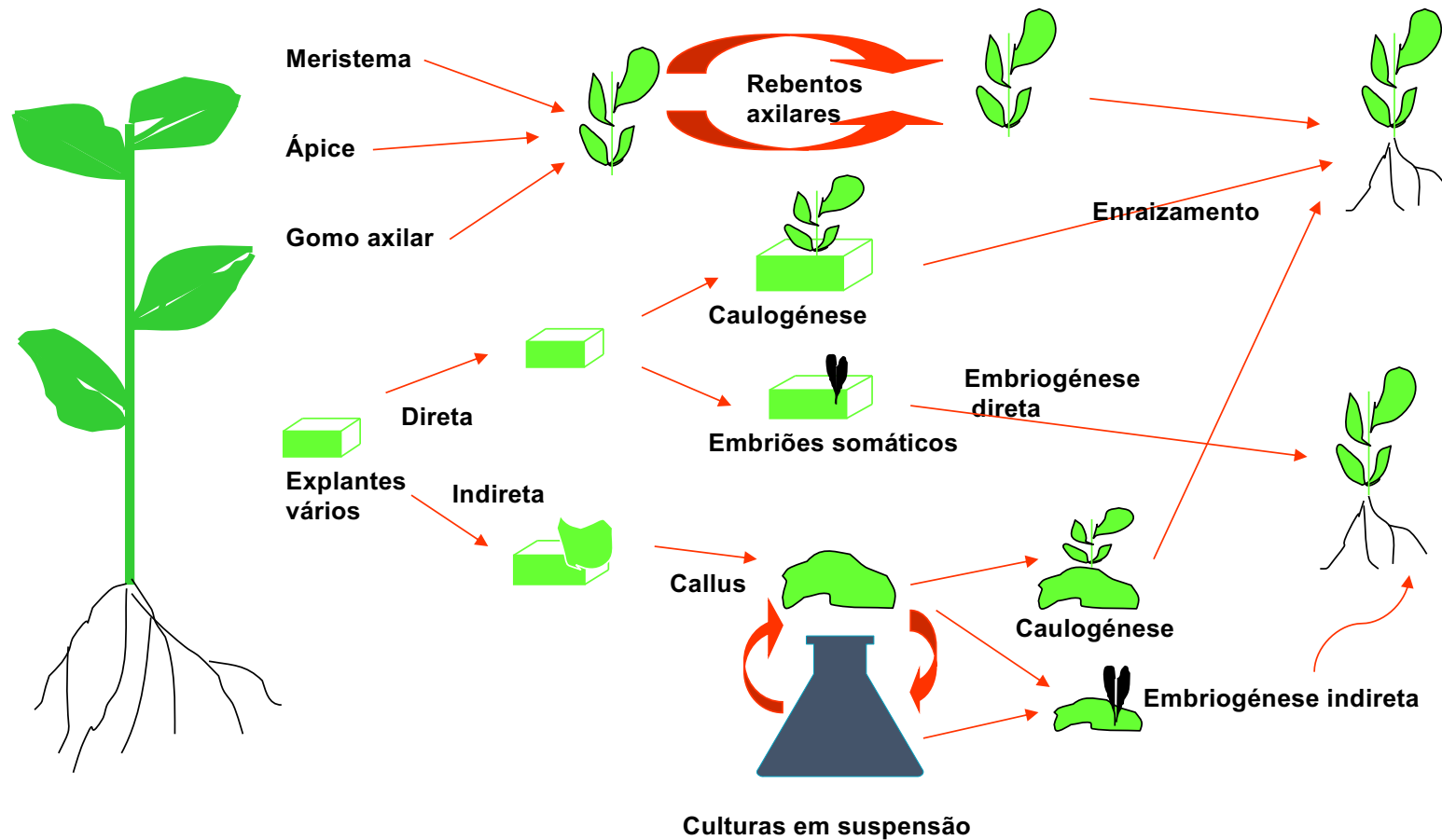
Principais métodos de micropropagação

Meristemas (apicais e axilares)

Organogénese / adventício (caulogénese e rizogénese)

Embriogénese somática

Principais métodos de micropropagação

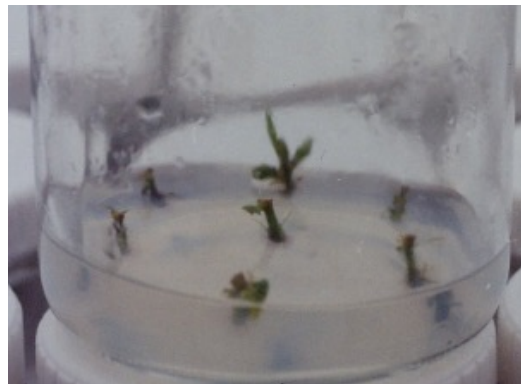


Principais métodos de micropropagação

Axilar:

Processo de desenvolvimento de meristemas pré-existentes (diferenciados (axilares) ou não)

menor taxa de multiplicação mas maior garantia de estabilidade genética (tx entre 3 e 6 rebentos)



Principais métodos de micropropagação

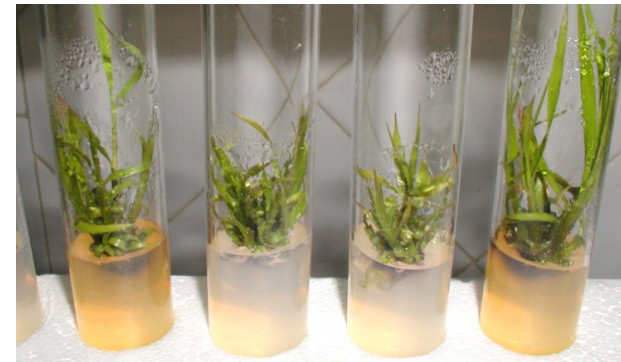
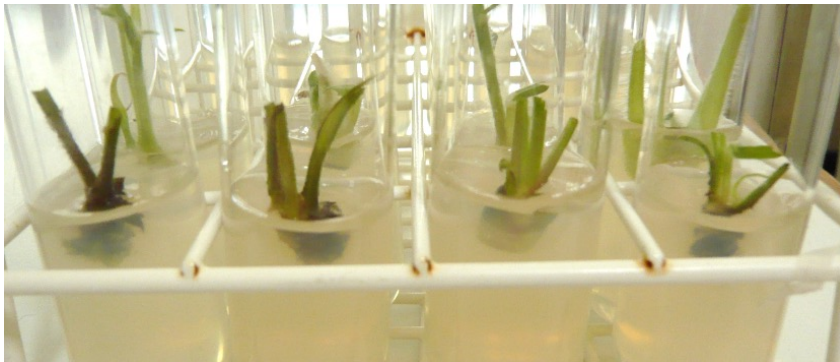
Organogénese (adventício):

Processo pelo qual células e tecidos são induzidos a sofrer determinadas modificações que levam à diferenciação de uma estrutura unipolar.

Direta: diferenciação de meristemas adventícios diretamente a partir de células ou tecidos do explante;

Indireta: diferenciação de meristemas adventícios a partir de calos

maior taxa de multiplicação mas menor garantia de estabilidade genética
(tx entre 6 até dezenas de rebentos)

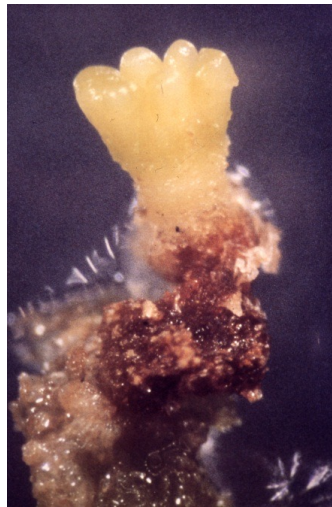


Principais métodos de micropropagação

Embriogénese somática:

Diferenciação de células somáticas em estruturas bipolares, com um polo radicular e um polo caulinar.

Máxima taxa de multiplicação mas menor garantia de estabilidade genética





Fases da micropropagação

Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue culture. Ann. Rev. Plant Phys., 25:135-166.

PLANT PROPAGATION THROUGH TISSUE CULTURES¹ ♦7565

Toshio Murashige

Department of Plant Sciences, University of California, Riverside, California 92502

CONTENTS	
THE ORCHIDS	138
STAGES OF THE TISSUE CULTURE METHOD	138
<i>Stage I: Establishment of the Aseptic Culture</i>	139
<i>Stage II: Multiplication of Propagula</i>	140
<i>Stage III: Preparation for Reestablishment of Plants in Soil</i>	140

- Fase I: Estabelecimento de culturas asséticas
- Fase II: Propagação dos rebentos
- Fase III: Preparação para reestabelecer as plantas no solo

Fases da micropropagação

Debergh, P.C.; Maene, L. (1981). A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Sci. Hort.*, 14:335-345.

Stock plants are grown under controlled conditions prior to in vitro culture in order to obtain healthier explants and uniform response (stage 0). After the establishment of aseptic cultures (stage I), buds are propagated (stage II), and are then prepared to harvest uniform cuttings (stage IIIa). Those cuttings are rooted under in vivo conditions (stage IIIb).

Fase 0: Preparação das plantas mãe stock para obtenção de explantes primários saudáveis

Fase I: Estabelecimento de culturas asséticas

Fase II: Propagação dos rebentos

Fase IIIa: Preparação dos rebentos para enraizar

Fase IIIb: Enraizamento dos rebentos in vivo

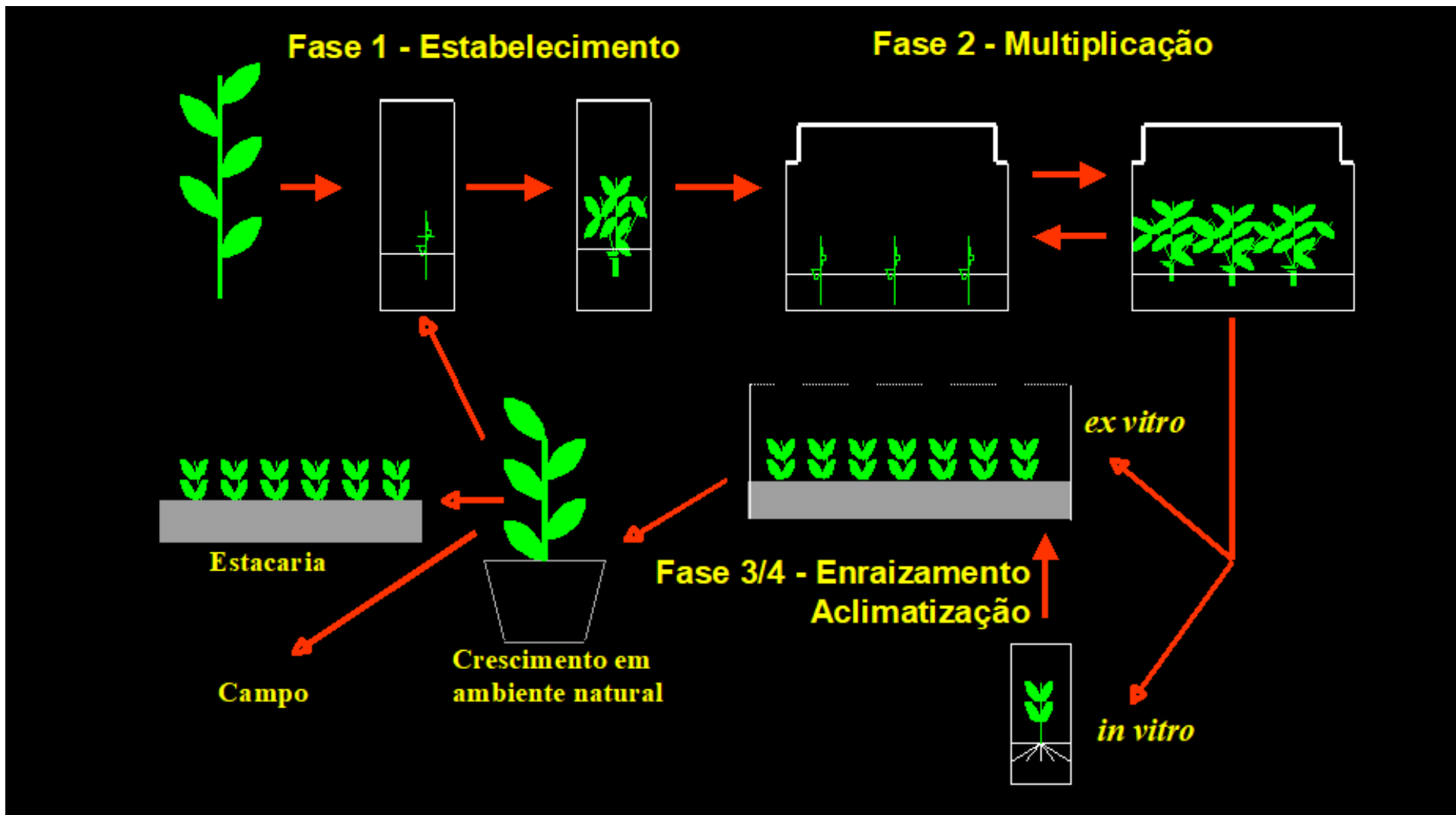
Fases da micropropagação

Fase 0 - Seleção da planta mãe e preparação do explante

Fase 1 - Estabelecimento em cultura assética

Fase 2 - Multiplicação

Fase 3/4 – Enraizamento / Transplante e aclimatização



Fases da micropropagação

Fase 0_ Seleção da planta mãe e preparação do explante

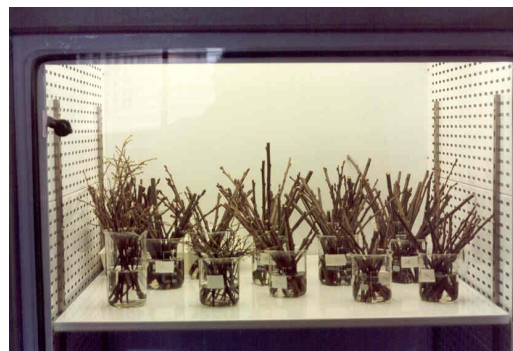
Envolve todos os processos de manipulação do material vegetal, desde a recolha até ao estabelecimento *in vitro*, incluindo os pré-tratamentos do material vegetal e sistemas de desinfeção.

Fatores a controlar:

Características genóticas

Idade e estado fisiológico da planta mãe

Idade e posição do tecido ou órgão na planta



Fase 0_ Seleção da planta mãe e preparação do explante



Fase 1_Estabelecimento em cultura assética

Passagem por água corrente (10 a 20 min)

Passagem por álcool a 70% durante 30 s a 2 min

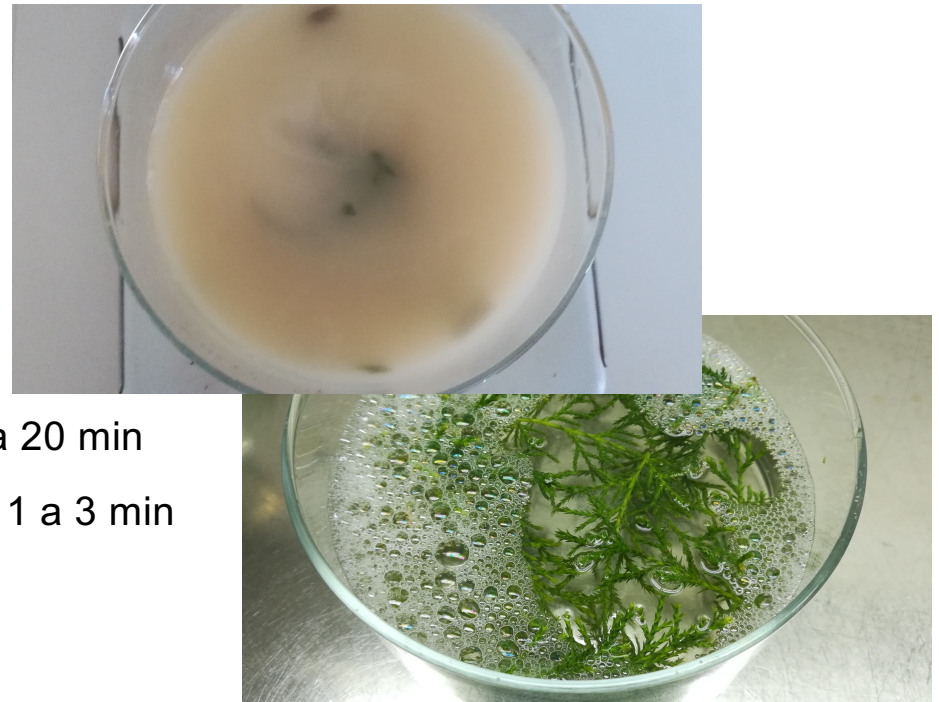
(câmara de fluxo laminar)

Imersão em fungicida durante 10 a 20 min

NaOCl em concentrações de 1:2 a 1:4 e tempos de 10 a 20 min

Cl₂Hg em concentrações de 0,1 a 0,01% em tempos de 1 a 3 min

3 a 4 passagem por água destilada e esterilizada



Nota: este processo de desinfeção é sempre superficial, não eliminando eventuais contaminações endógenas.

Fase 1_Estabelecimento em cultura assética

Inclui o isolamento do explante e a sua colocação em condições asséticas no meio de cultura.

Fatores a controlar:

- Contaminação das culturas por agentes patogénicos
- Inibição do crescimento por fenóis e polifenóis
- Formulação nutritiva / Reguladores de crescimento
- Condições físicas de cultura



Fase 2_Multiplicação

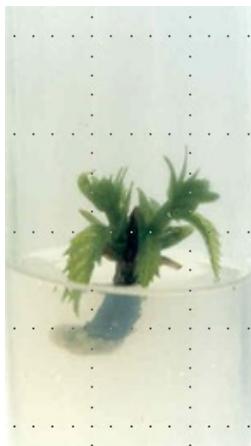
De acordo com a metodologia utilizada o principal objetivo é conseguir propagar sem perda de estabilidade genética

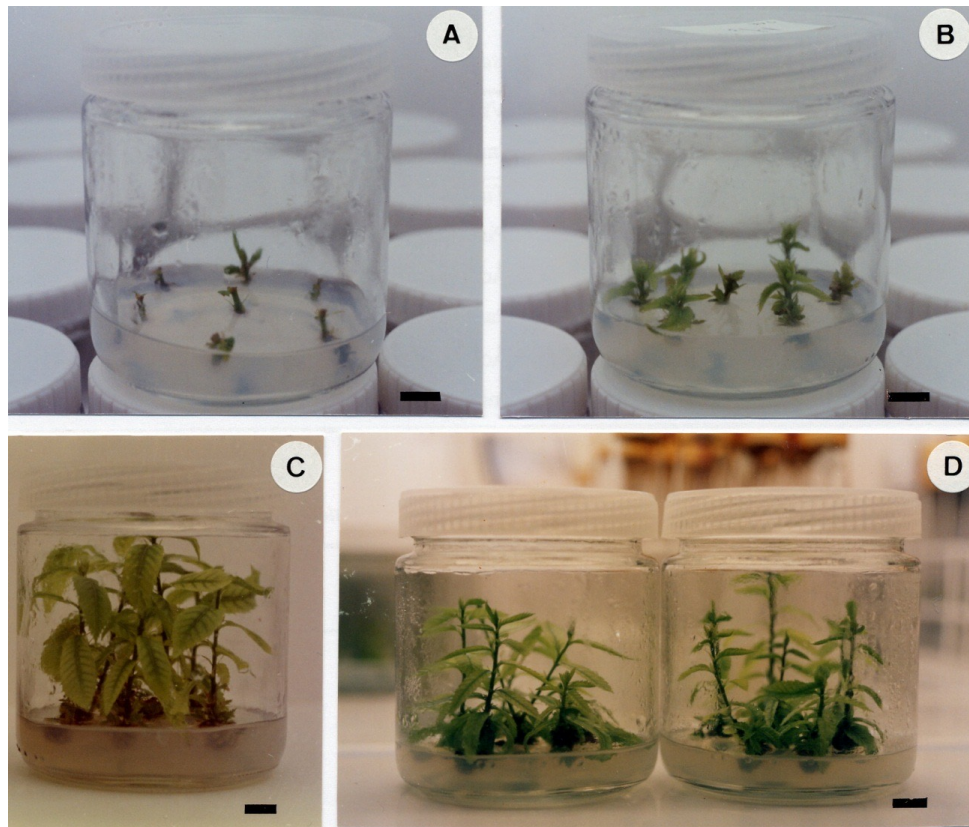
Fatores a controlar:

Características genótípicas

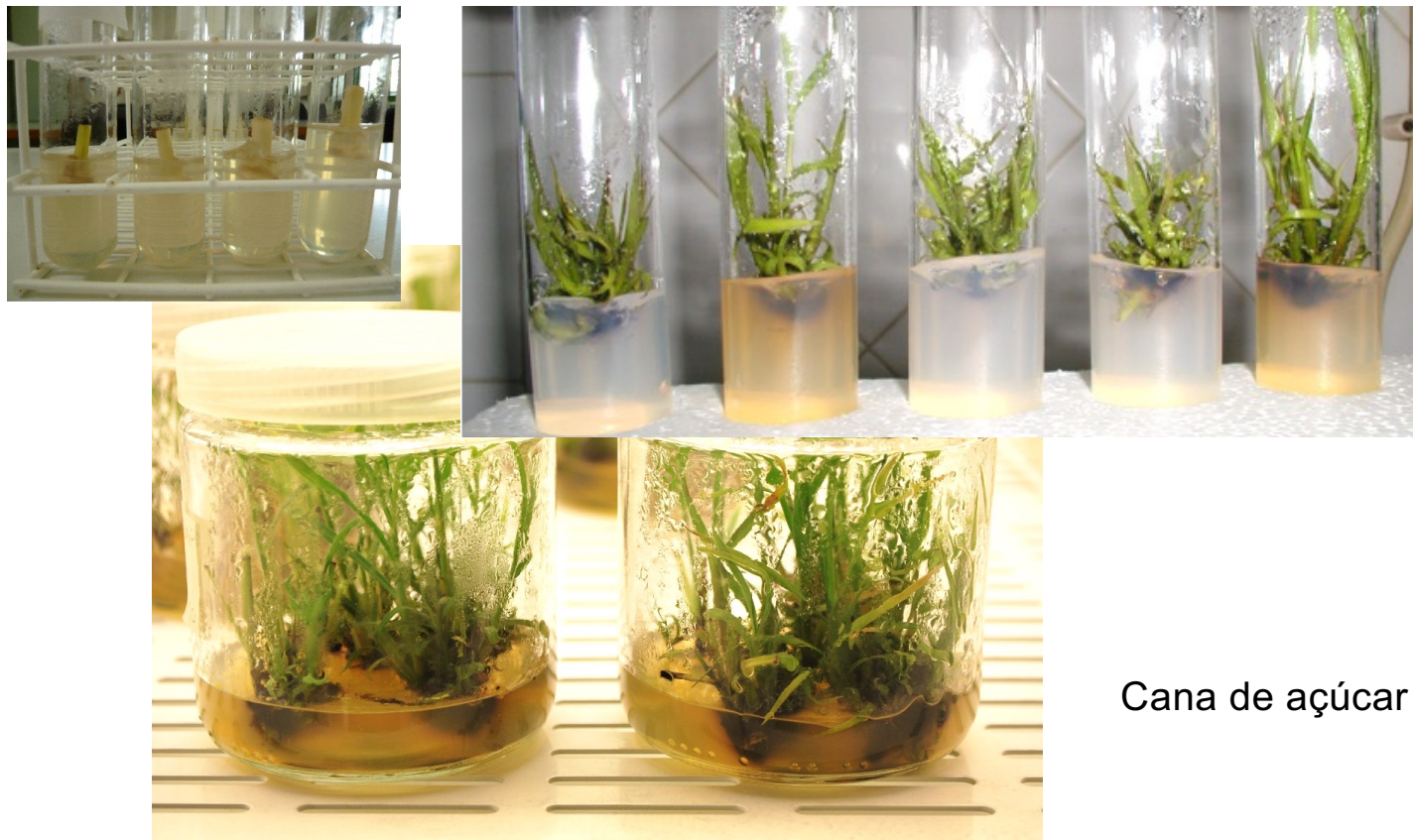
Formulação nutritiva / Reguladores de crescimento

Condições de cultura





Castanheiro



Cana de açúcar

Camarinha



Biorreatores:

Utilização na multiplicação de plantas

Sistemas de micropropagação em meio agarizado (semissólido)

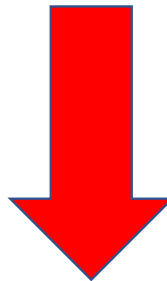
Vantagens

- ✓ Permite um excelente meio de sustentação dos explantes/rebentos
- ✓ Em caso de contaminação, a perda de explantes é reduzida
- ✓ Os mecanismos de hiperhidricidade são pouco frequentes



Desvantagens

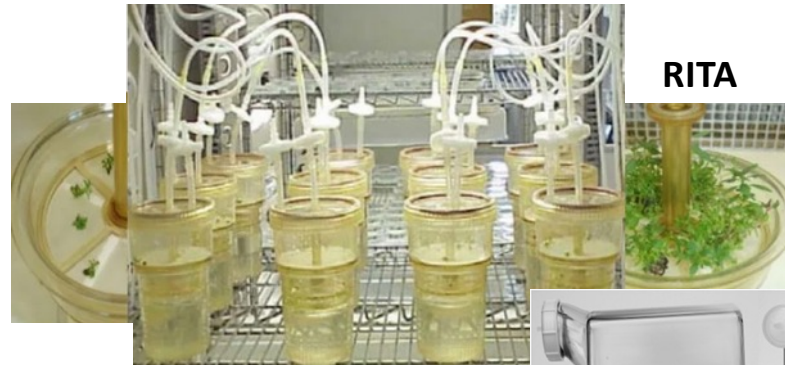
- ✓ Taxas de multiplicação relativamente baixas
- ✓ Preparação de meios bastante demorada (dissolução do agar)
- ✓ Aumenta os custos de mão de obra
- ✓ Necessidade de maiores áreas nas câmaras de cultura



Biorreatores:

Utilização na multiplicação de plantas

Equipamentos que permitem manter estruturas biológicas em atividade com controlo automatizado de fatores nutricionais, físicos e químicos indispensáveis ao bom funcionamento celular.



Biorreatores:

Utilização na multiplicação de plantas

Vantagens

- Aumento do número de explantes por área de prateleira
- Melhor controlo das condições da cultura
- Fornecimento ótimo de nutriente/bioregulador
- Automação do processo
- Facilidade na mudança e adequação do meio

Desvantagens

- Risco de hiperhidricidade nos explantes
- Variação do tamanho da plântula
- Contaminação microbiana
- Recalcitrância de algumas espécies



Biorreatores:

Utilização na multiplicação de plantas

Redução na Mão-de-Obra

Menos tempo de preparação do meio
Redução do número de frascos
Redução da frequência de repicagens
Menor tempo de etiquetagem

Redução nos Gastos de Energia

Reduz esterilização em autoclave
Esterilização de meios por filtração, química
Maior quantidade de plantas por área na sala de cultura

Maiores segurança quanto a assepsia

Maiores flexibilidade de produção

Menor custo de produção

Biorreatores:

Utilização na multiplicação de plantas

Biorreator	Descrição	Aplicação
Arejamento por agitador “aeration agitation”	Agitação por hélices em eixo giratório	Cultivo celular e embriões somáticos
Tambor rotatório “roller drum”	Movimento leve e rotacional em dois eixos	Cultivo de embriões e rebentos
Filtro rotatório “spin filter”	Filtro conectado ao eixo central por membrana.	Cultivo de embriões somáticos
Borbulhamento “air driven”	Borbulhamento de ar no fundo do frasco.	Multiplicação de gemas e alongamento de rebentos
Levantamento de ar “air lift”	Borbulhamento de ar dentro de tubo vertical	Multiplicação de gemas e alongamento de rebentos
Fase gasosa “gaseous phase”	Meio cultura pulverizado sobre o explante	Cultivo de células, tecidos e órgãos
Arejamento por membrana porosa “permeable membrane aerator”	Arejamento via canalização porosa em espiral	Cultivo de tecidos e órgãos
Sobre-arejamento “overlay aeration”	Arejamento via ventilação forçada sobre o meio	Cultivo de células e tecidos
Imersão temporária “temporary imersion”	Meio em contacto com o explante por tempo controlado	Multiplicação de gemas e alongamento de rebentos; enraizamento e aclimatização

Biorreatores:

Utilização na multiplicação de plantas

Imersão Contínua vs Imersão Temporária

Imersão Contínua:

- Complexos, do ponto de vista da montagem e funcionamento
- Não são versáteis no seu uso
- De difícil manipulação, durante as fases de carga, descarga e troca de meio
- Material vegetal mais sujeito a hiperhidricidade

Imersão Temporária:

- Mais simples, do ponto de vista da montagem e funcionamento
- Mais versáteis no seu uso
- Os processos de carga, descarga e troca de meio podem ser todos automatizados
- Material vegetal menos sujeito a hiperhidricidade

Biorreatores:

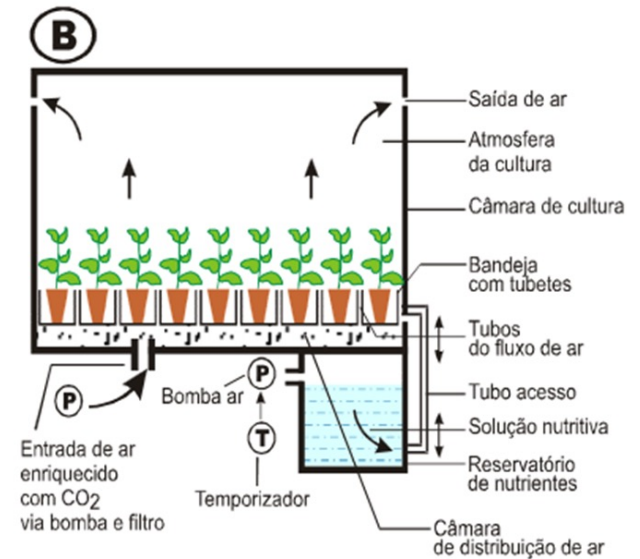
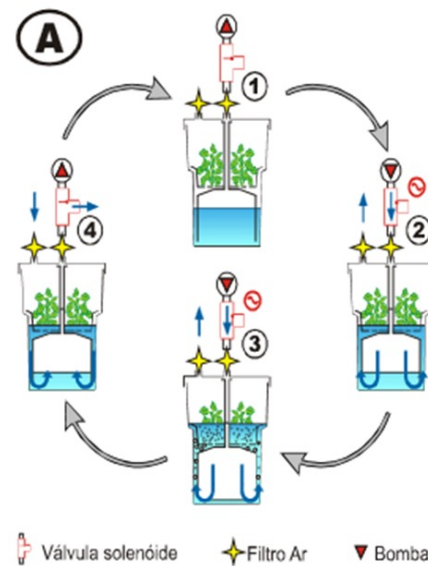
Utilização na multiplicação de plantas

Biorreatores de Imersão Temporária⁽¹⁾ (BIT)

RITA – Récipient d'Immersion Temporaire Automatisé

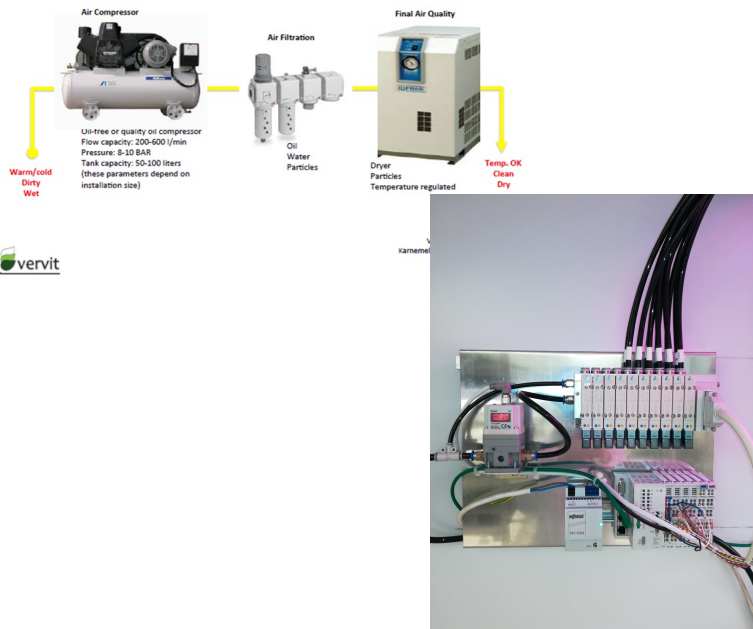
TRI – Temporary Root Immersion

RITA ⁽²⁾	TRI ⁽³⁾
Imersão da parte aérea	Imersão da parte radicular
Cultivo heterotrófico	Cultivo autotrófico
Baixo risco contaminação	Ausência de contaminação
Ideal para multiplicação	Ideal para enraizamento/aclimatização
Baixa hiperhidricidade	Ausência de hiperhidricidade



Biorreatores:

Utilização na multiplicação de plantas

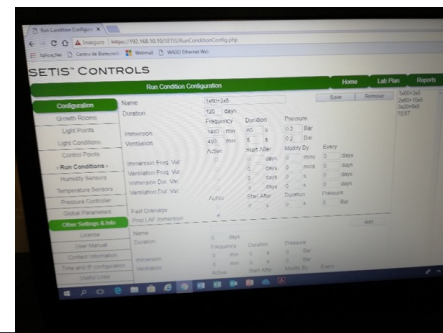
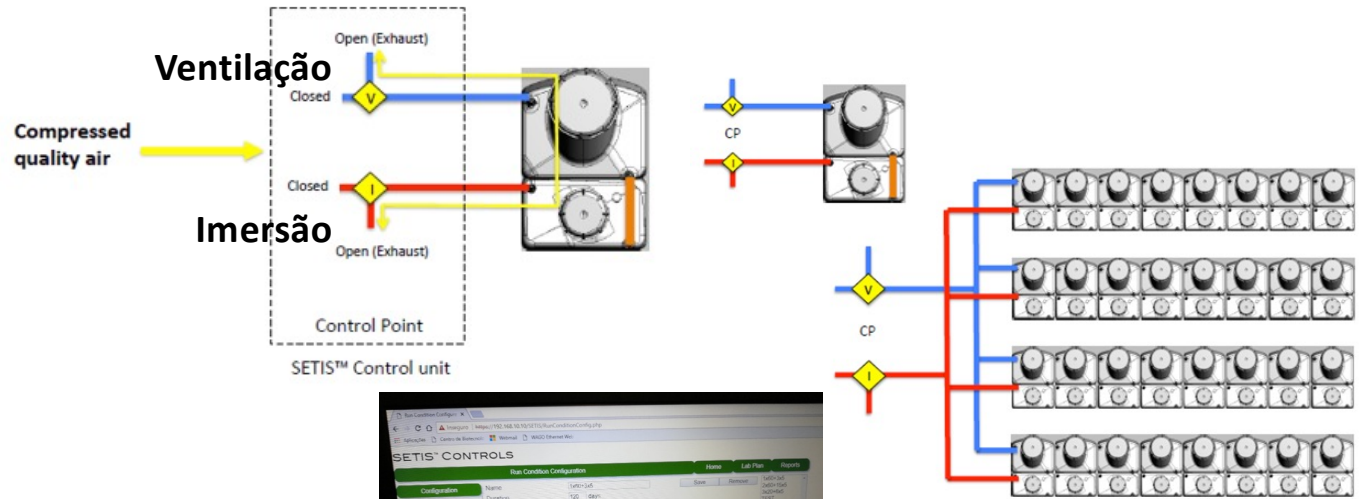


SETIS™

<https://setis-systems.be/home>

<http://www.vervit.be/home>

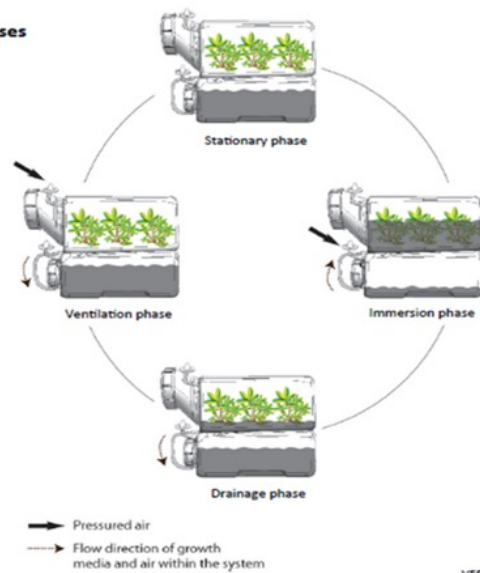
Powered by 



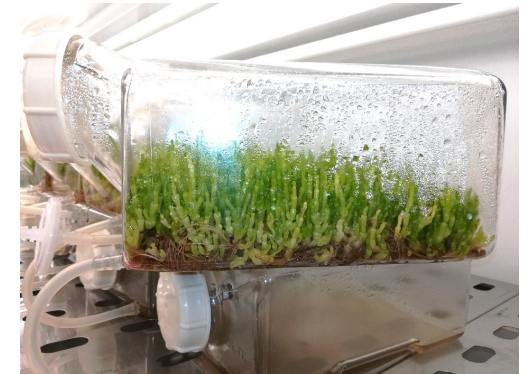
Biorreatores:

Utilização na multiplicação de plantas

SETIS™ bioreactor phases



VERVIT © 2014 All Rights Reserved
Karnemelkstraat 2-4, 9060 Zelzate, Belgium
info@vervit.be / www.vervit.be

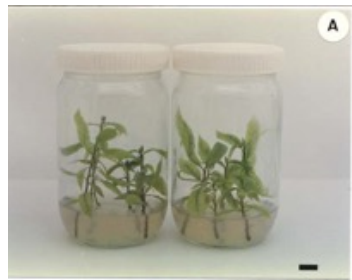


Fase 3_Enraizamento

Consiste na formação de raízes adventícias, quer *in vitro* quer *in vivo*, podendo haver necessidade de uma fase prévia de alongamento dos rebentos obtidos na fase 2.



Metodologias de enraizamento



A

Indução

Expressão

Auxina no meio

meio c/ ou s/ auxina

Auxina por imersão

substrato

Aclimatização



B

Indução

Em condições assépticas

In vitro



Com auxina no meio [1 mg^l⁻¹ a 50 mg^l⁻¹] - (7 a 1 dia)
Imersão [1 g^l⁻¹ a 3 g^l⁻¹] - (2' a 30'')

Em condições não assépticas

Ex vitro



Com auxina no meio [25 a 50 mg^l⁻¹] - (2 a 1 dia)
Imersão [1 g^l⁻¹ a 3 g^l⁻¹] - (2' a 30'')



Figura 2.4. Sistemas de indução radicular. (A) Indução com AIB 3 mg^l⁻¹ no meio de cultura durante 5 dias. (B) Indução por imersão basal dos rebentos numa solução de AIB 1 g^l⁻¹ durante 1 minuto. A barra representa 1 cm

Expressão

In vitro



Em meio c/ ou s/ auxina (3/4/5 semanas)

Ex vitro



Em substrato (3/4/5 semanas)



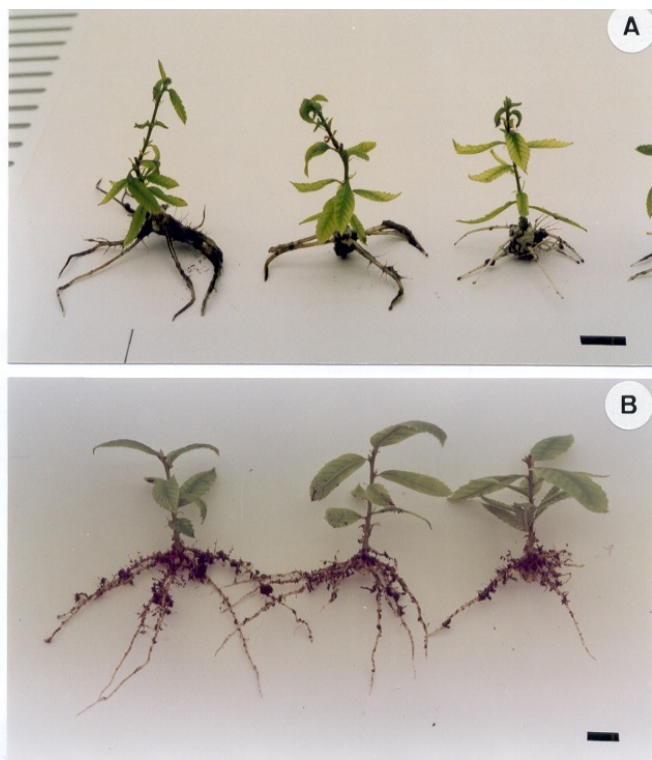


Figura 3.2. Aspecto de rebentos de castanheiro no final da fase de enraizamento. **(A)** Rebentos com expressão e desenvolvimento radicular in vitro. **(B)** Rebentos com expressão e desenvolvimento radicular ex vitro. A barra representa 1 cm.

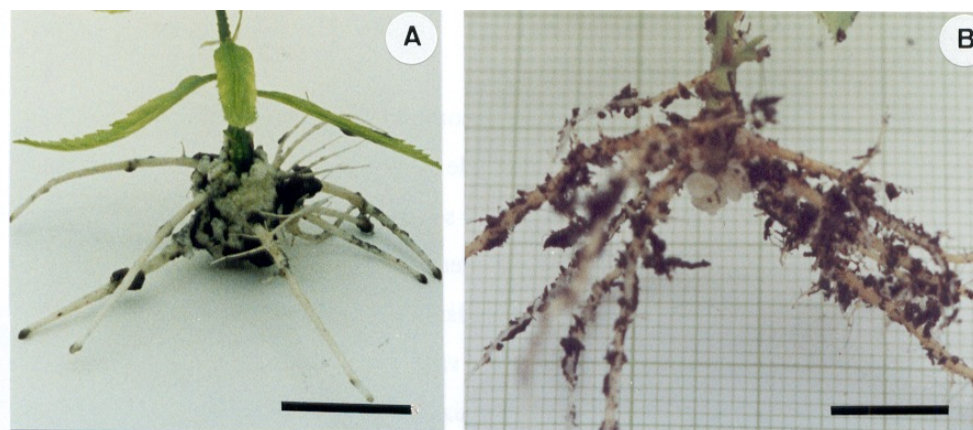
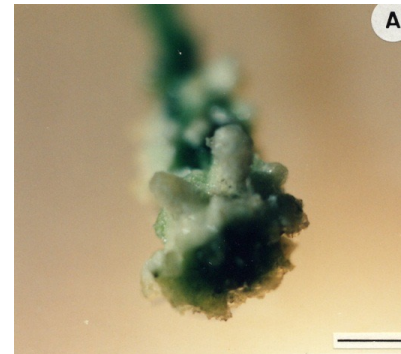
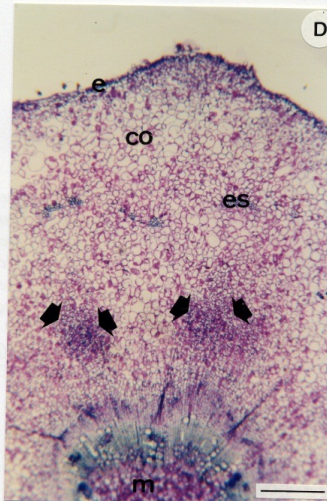
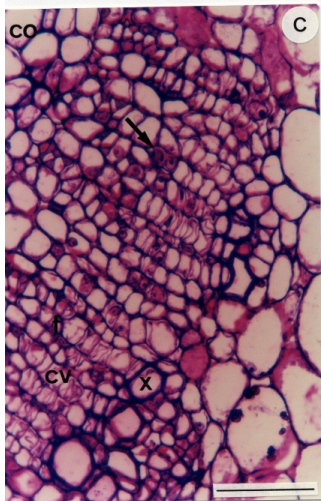
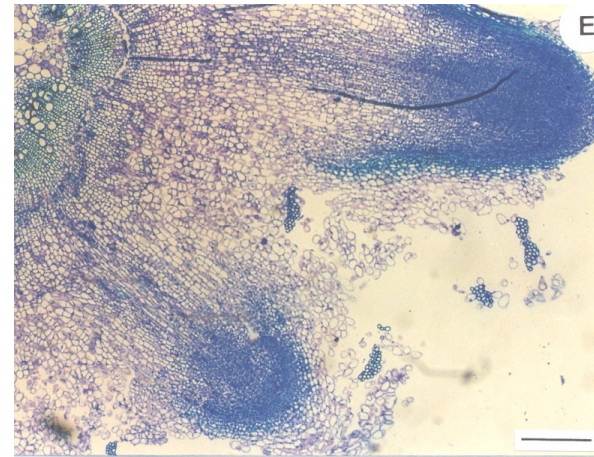
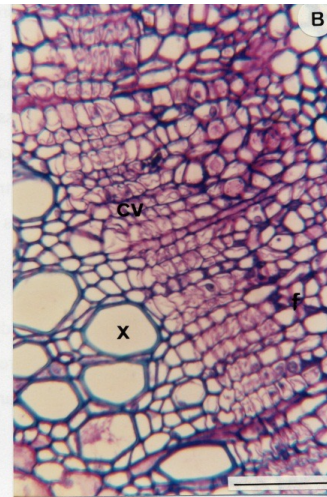
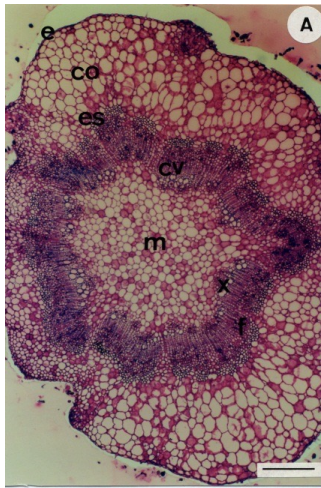


Figura 3.3. Pormenor do sistema de ramificação radicular. **(A)** Rebroto com enraizamento in vitro. **(B)** Rebroto com enraizamento ex vitro. A barra representa 1 cm.





Fase 4_Aclimatização

Processo de adaptação gradual das microplantas às condições ambientais naturais de luz, humidade e temperatura.

Fatores fisiológicos: (plantas regeneradas em ambiente artificial)

- **necrose apical** (metabolismo das citocininas)
- **não há controlo nas trocas gasosas** (estomas pouco funcionais)
- **taxas de fotossíntese muito baixas** (aparelho fotossintético muito deficiente)
- **absorção radicular incipiente** (sistema radicular em início de funcionamento)

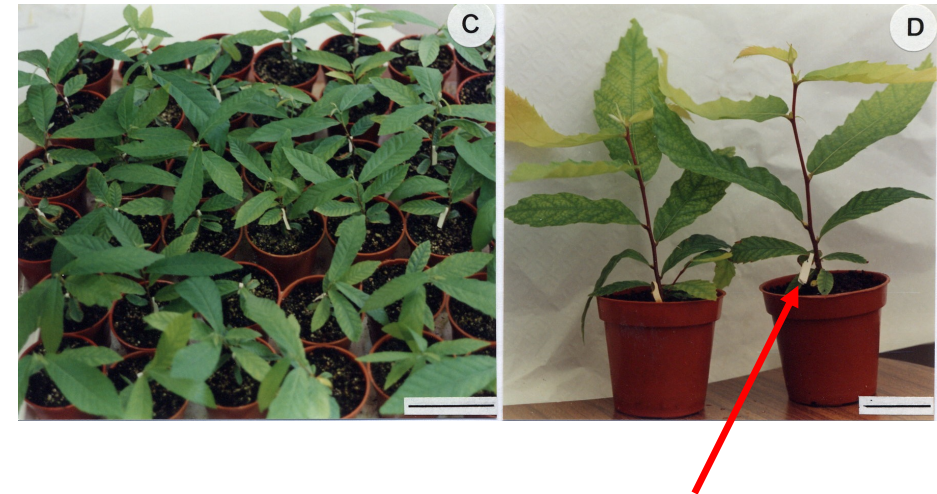
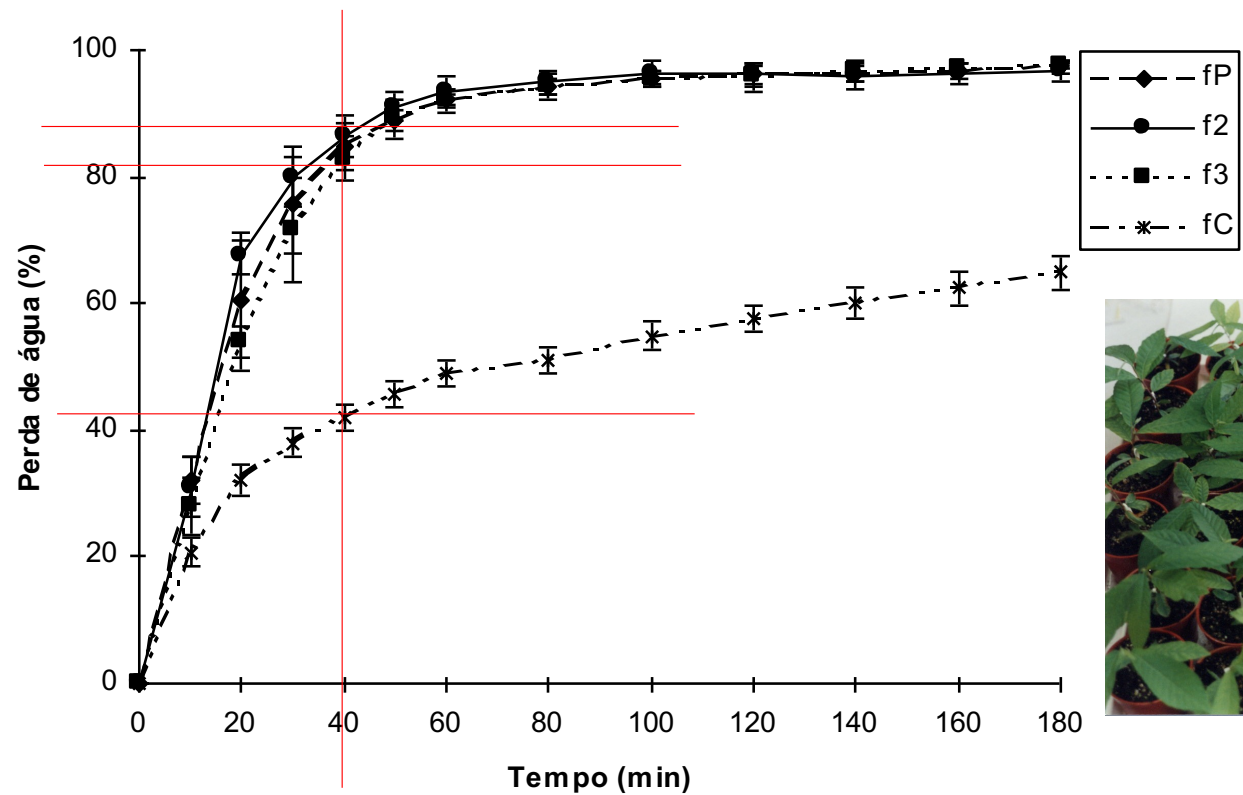


Figura 4.25. Variação da perda de água determinada em discos em folhas persistentes (fP), folha dois (f2) e folha três (f3) de plantas de castanheiro com enraizamento ex vitro no final da aclimatização a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiância e em folhas de plantas de campo micropropagadas (fC).

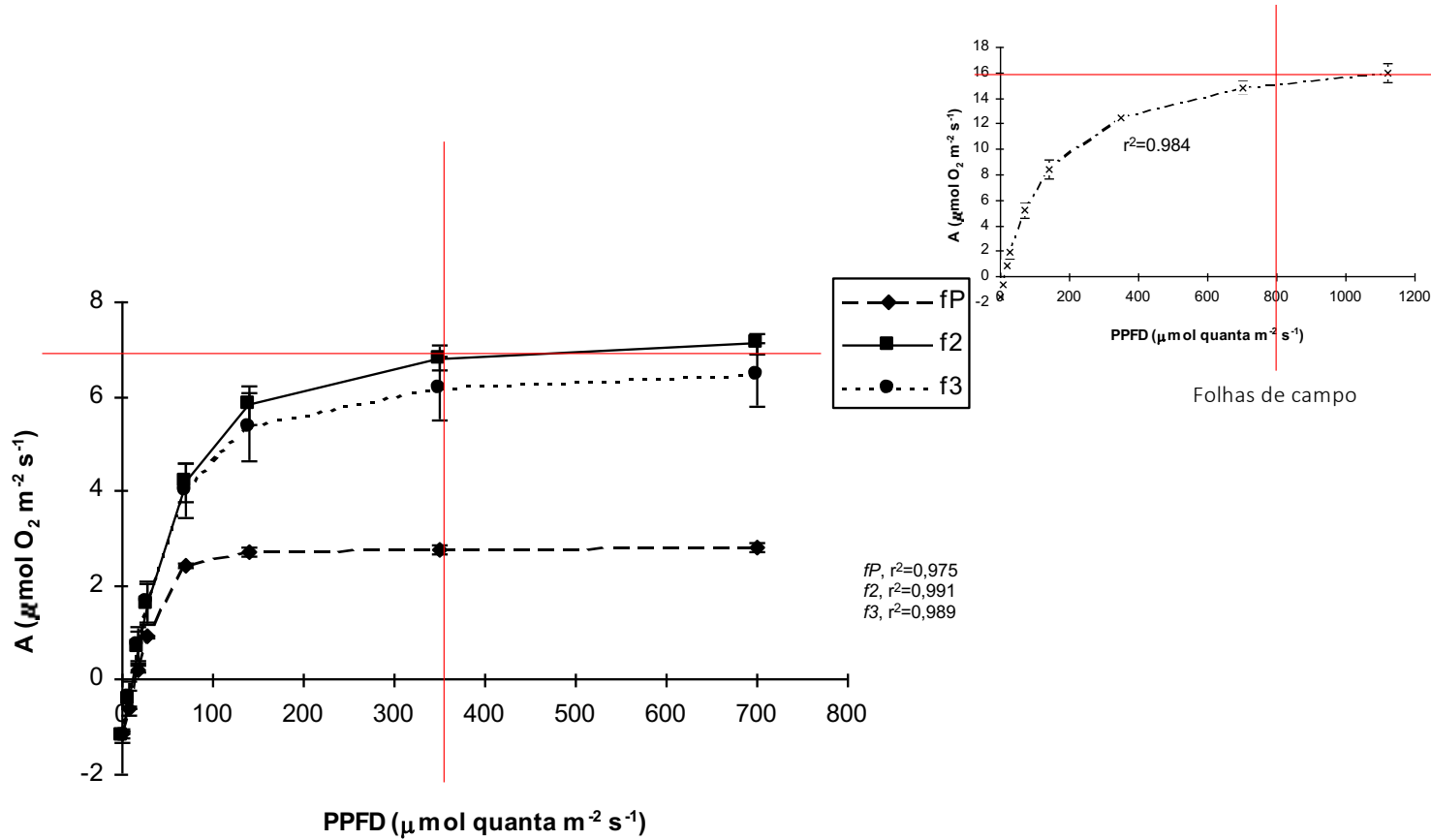
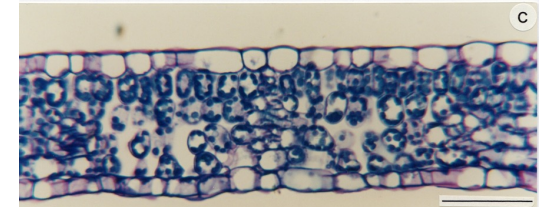
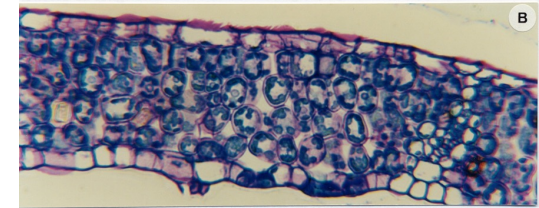
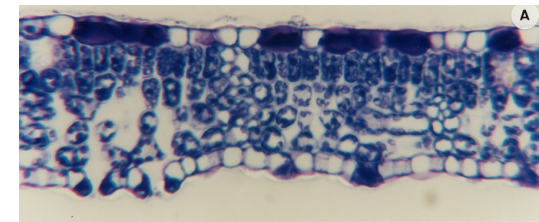
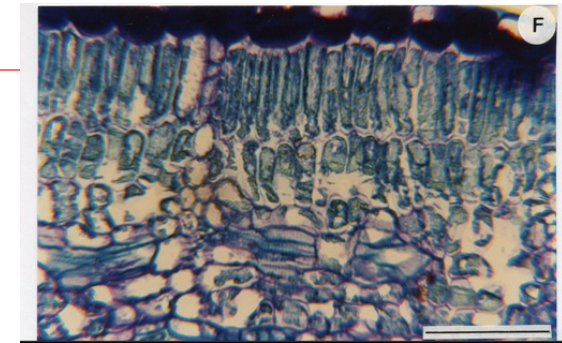


Figura 4.37. Curvas de resposta à irradiância da taxa de libertação de O_2 , medida a 25°C e CO_2 saturante, em discos foliares dos diferentes tipos de folhas analisadas (fP, f2 e f3), de plantas de castanheiro com enraizamento ex vitro e aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, após 4 semanas de aclimatização. Os valores representam média \pm erro padrão de três repetições.



Fase 4_Aclimatização

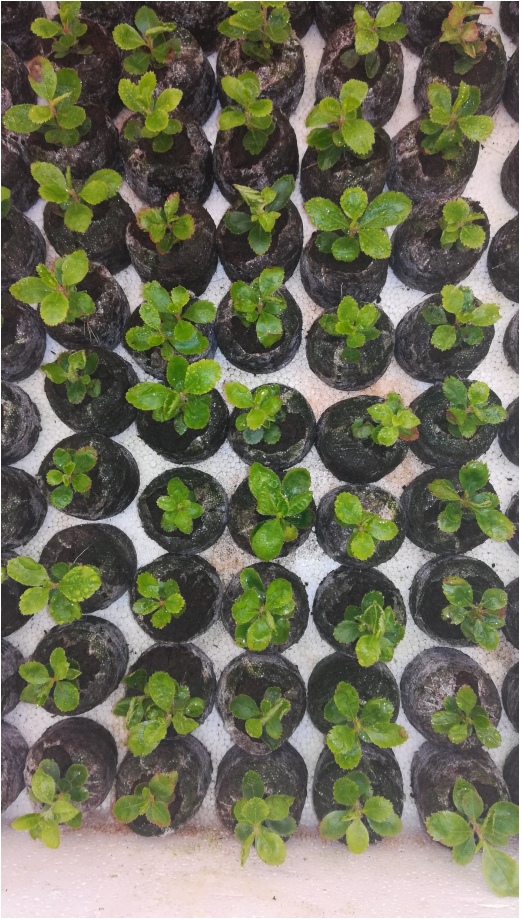
Humidade (diminuição gradual de 90/95% para 50% HR)

Luz (aumento gradual até 250/500/1000 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$)

Controlo sanitário

Desenvolve-se em estufas ou túneis de aclimatização com humidade controlada

Condições de enraizamento *ex vitro* / aclimatização



Túneis de aclimatização







Pomar de castanheiros no 1º ano de enxertia



Pomar de medronheiros no 2º ano de plantação



Infraestrutura laboratorial
do Sistema Científico e
Tecnológico Nacional
(SCTN)

Centro de Valorização e
Transferência de
Tecnologia (ANI)



Financiado pelo Programa Mais Centro



EIXO 1 - Competitividade, Inovação e Conhecimento

Operação: CENTRO-07-CT62-FEDER-005002

Requalificação de edifício
Equipamento laboratório
Equipamento de campo







Missão:

Criar conhecimento e valorizar a investigação na área da biotecnologia das plantas associada aos setores produtivos da fileira agrícola, florestal e das plantas aromáticas e medicinais.



Objetivos:

-  Desenvolver conhecimento ligado à biotecnologia das plantas e promover a sua utilização como fator de promoção da atividade económica
-  Estabelecer parcerias e fornecer produtos e serviços que possibilitem a criação e o crescimento de empresas ligadas aos setores produtivos das fileiras agrícola, florestal e das plantas aromáticas e medicinais
-  Disponibilizar infraestruturas, tecnologia e apoio a empresas start-up e spin-off
-  Colaborar com instituições de I&D nacionais e internacionais no desenvolvimento de projetos



O que fazemos?

Bioprospeção

- Privilegiando a flora autóctone fazemos bioprospeção de metabolitos secundários com bioatividade (extraímos, identificamos e caracterizamos)

Biodiversidade

- Identificamos, caracterizamos, multiplicamos e conservamos espécies, variedades e cultivares



CENTRO
DE BIOTECNOLOGIA
DE PLANTAS
DA BEIRA INTERIOR



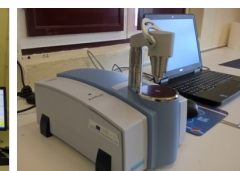
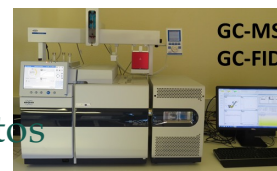
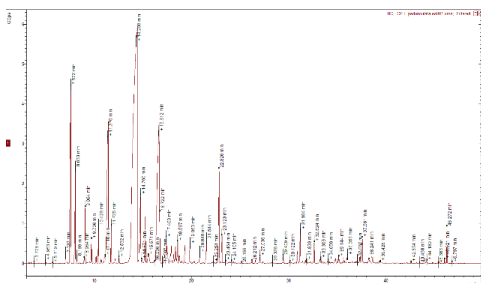


Organização técnico-científica

- Conselho Científico constituído por todos os investigadores seniores
- Coordenadores das Áreas Laboratoriais
 - **Fitoquímica**
 - **Biologia Molecular**
 - **Micropropagação**



Fitoquímica:



Extração de compostos

Análises de cromatografia (com GC, FID e MS)

Análises de espectroscopia de infravermelho (com FTIR, NIR e RAMAN)

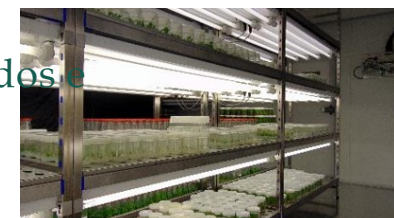
Biologia molecular:

Análise de fragmentos em sequenciador



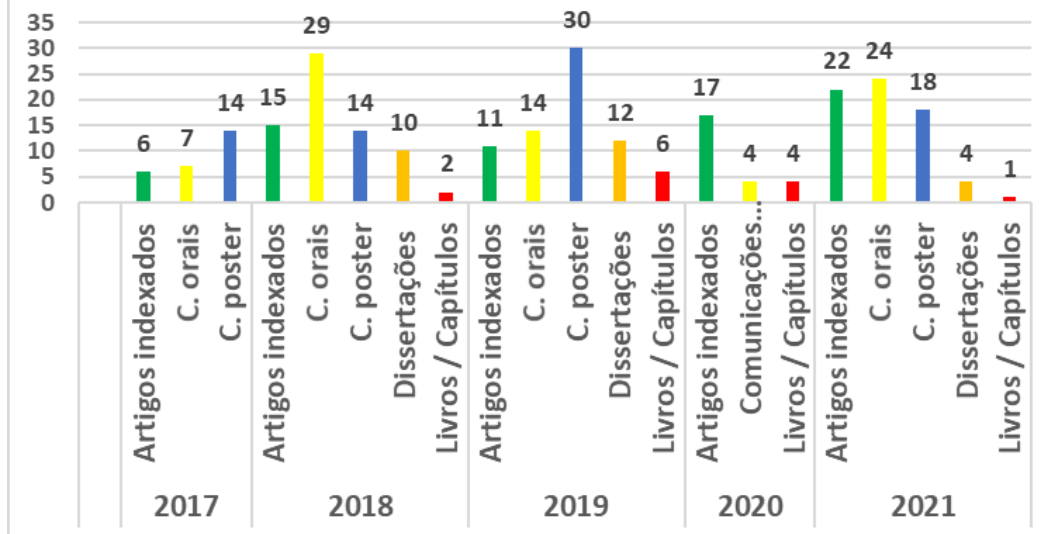
Multiplicação de plantas:

Micropropagação por sistemas semisólidos
Biorreatores de Imersão Temporária

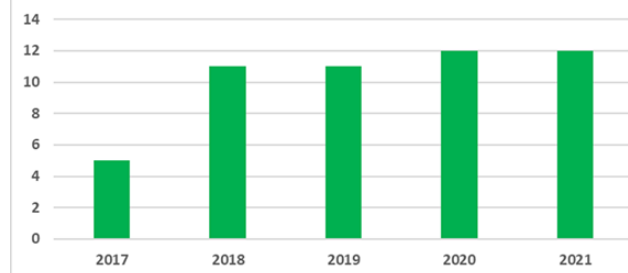




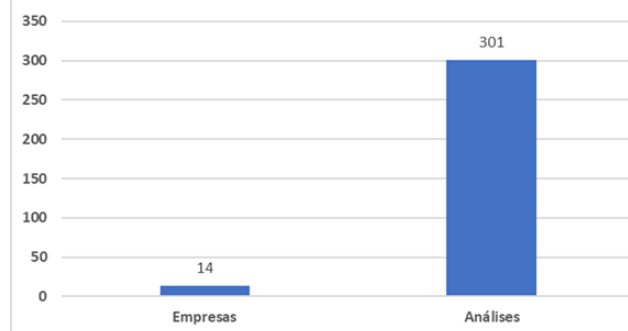
Produção Científica



Projetos



Prestação de serviços





CENTRO
DE BIOTECNOLOGIA
DE PLANTAS
DA BEIRA INTERIOR



CENTRO
DE BIOTECNOLOGIA
DE PLANTAS
DA BEIRA INTERIOR

Um ano de atividade



<http://cbpbi.ipcb.pt>

Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior
Qta Sr^a de Mércules
6001-909 Castelo Branco
E-mail: cbpbi@ipcb.pt
Telefone: 272339900
Coordenadas: 39.819397° N , 7.453881° W



<https://www.facebook.com/profile.php?id=100049913963110>

Muito obrigado.

José Carlos Gonçalves

Escola Superior Agrária de Castelo Branco

jcgoncalves@ipcb.pt