

# Sistemas *in vitro* de multiplicação de plantas: presente e futuro (I)

José Carlos Gonçalves (\*)  
Maria Teresa Coelho (\*\*)



## Resumo

Referem-se alguns dos aspectos históricos que mais contribuíram para o desenvolvimento do conhecimento na área da cultura de tecidos vegetais, bem como a grande diversidade de aplicações e utilização destas metodologias, desde os estudos fisiológicos, interacções substâncias/planta, produção de metabolitos secundários, manipulação genética e melhoramento até à sua utilização como uma poderosa metodologia na multiplicação de plantas, quer por rebentamento adventício, axilar e embriogénese somática.

Faz-se uma descrição sucinta dos aspectos que maior impacto têm vindo a ter com a utilização destas metodologias nos diferentes grupos de culturas vegetais, nomeadamente nas culturas extensivas, hortícolas, ornamentais, fruteiras e florestais.

## 1. Introdução

Os princípios fundamentais que suportam a possibilidade de cultivar tecidos vegetais em condições artificiais estão contidos na teoria celular proposta por Schleiden e Schwann. De facto, postula esta teoria, que a célula

vegetal tem capacidade de autonomia e mesmo de totipotência e, como tal, capacidade de regenerar até se obter uma nova planta completa.

A primeira tentativa de cultivar células e/ou tecidos vegetais, surgiu com Haberlandt em 1902. Embora não tenha sido bem sucedido, este investigador é hoje considerado como o fundador da cultura de tecidos vegetais em meios de cultura artificiais.

Em 1927, Went conseguia isolar a primeira das várias substâncias de natureza auxínica, que promovem crescimento celular. Quimicamente identificou-se como sendo ácido 3-indol acético e, logo que se começaram a verificar os efeitos desta substância nos tecidos vegetais, três autores, White, Nobécourt e Gautheret publicam em 1939, independentemente, resultados obtidos na cultura de tecidos vegetais *in vitro* por longos períodos de tempo, sendo estes trabalhos considerados como pioneiros. Desde então, o ritmo das descobertas foi sendo cada vez maior.

Em 1955, Miller, Skoog e colaboradores conseguem isolar e identificar uma substância que se formava após autoclavagem do leite de coco e que tão extraordinários resultados estava a permitir obter, à qual foi dado o nome de cinetina (Miller *et al.*, 1955).

Os numerosos ensaios de associação de auxinas com citocininas e a apresentação de novas formulações nutritivas cada vez mais adaptadas às necessidades fisiológicas das células vegetais propostas, entre outros, por Heller (1953), Murashige e Skoog (1962), Schenk

e Hildebrandt (1972) e Greshoff e Doy (1972), permitiram que fosse possível estabelecer *in vitro*, uma cada vez maior diversidade de células, tecidos e órgãos pertencentes a diferentes espécies.

Estas técnicas foram rapidamente aplicadas a estudos de morfogénese, permitindo a comparação do desenvolvimento da estrutura da planta obtida *in vitro* com o da planta crescendo em ambiente natural e, como tal, significativos acréscimos do conhecimento nas áreas de histogénese e organogénese. Com base nestes estudos cedo se verificaram as potencialidades destes sistemas de regeneração *in vitro* na propagação de plantas, o que mais tarde se viria a chamar de micropropagação ou propagação *in vitro*. A sua primeira aplicação com grande sucesso foi feita por Morel (1964) para a obtenção de plantas isentas de vírus e propagação clonal de orquídeas.

## 2. Sistemas de cultura de tecidos e suas aplicações

Foi com base na utilização dos diferentes sistemas de cultura de tecidos que foi possível aprofundar e obter novas linhas de investigação. Assim, as culturas de *calli*, que podem ser obtidas quer directamente dos explants iniciais, quer de células já em cultura, são hoje utilizadas como excelentes meios para obtenção de organogénese indirecta (George e Sherrington, 1984; Pierik, 1987), de rebentamento adventício, quer por embriogénese somática quer por cultura de células em suspensão; são um extraordinário meio no campo do melhoramento, através da obtenção de variabilidade somaclonal (Ahuja, 1987) e tendo ainda aplicação no campo da fisiologia, patologia e criopreservação.

A cultura de células em suspensão, é hoje utilizada para a produção de metabolitos primários e secundários de grande aplicação industrial; é, teoricamente, um extraordinário sistema para propagação de plantas em larga escala; no campo da fisiologia permite estudar o comportamento da célula isolada, sendo assim quebradas todas as interacções a nível tecidual; no campo da patologia tornou possível o estudo da interacção parasita/célula ao nível da acção de toxinas nas membranas e organitos, em ambiente controlado e livre de qualquer outro contaminante.

A cultura de protoplastos tem permitido uma elucidação na especificidade e modo de acção de fungos e bactérias no metabolismo celular, em particular nas bases genéticas da resposta de resistência ou de susceptibilidade das plantas a um factor específico, já que, a parede celular, que por vezes pode ser impeditiva dessa relação, está ausente. Estes sistemas têm permitido ainda significativos avanços no campo da genética e melhoramento já que por fusão é possível a obtenção de híbridos somáticos, com a consequente supressão de barreiras de incompatibilidade sexual, permitindo a obtenção de novas espécies aloplóides. Os sistemas de protoplastos constituem ainda um óptimo sistema para aplicação da tecnologia de DNA recombinante

e consequente obtenção de plantas transformadas (Lindsey e Jones, 1989).

A cultura de anteras e/ou grãos de pólen tem sido um sistema utilizado, cada vez com maior êxito, para a produção de linhas homocigóticas por duplos haplóides e mesmo para a obtenção de plantas haplóides por androgénese, com grande aplicação em programas de melhoramento.

Todos os sistemas atrás referidos podem ser considerados como sistemas de cultura desorganizados (George e Sherrington, 1984), já que em todos eles as células passam por uma fase de dediferenciação, aumentando o volume tecidual com total ausência de estruturas organizadas e contendo apenas um limitado número de diferentes células especializadas. Ao contrário, os sistemas de cultura organizados, baseiam-se na continuidade do crescimento e preservação das estruturas histológicas já existentes, dependendo exclusivamente do tipo de estrutura em cultura e do tipo de pré-determinação genética que as células receberam (George e Sherrington, 1984).

A cultura de órgãos determinados, isto é, que estão destinados a possuir um tamanho e forma definidos, tais como folhas, flores e frutos, têm permitido o estudo de efeitos de reguladores de crescimento no desenvolvimento destes órgãos, mas é, sem dúvida, a cultura de órgãos com crescimento indeterminado, ou seja, cujo crescimento é potencialmente ilimitado, tais como tecidos meristemáticos apicais de caules ou de raízes, que maior aplicação e impacto tem provocado na propagação vegetativa.

De especial importância se reveste a utilização de meristemas e ápices caulinares, já que são o sistema até hoje mais utilizado na propagação vegetativa e isto porque, apesar de todos os sistemas já referidos permitirem a regeneração de plantas completas, a propagação *in vitro* por gomos apicais e/ou axilares apresenta os mais baixos níveis de variabilidade genética, garantindo assim uma elevada manutenção da estabilidade genotípica e, conseqüentemente, fenotípica, dos indivíduos assim obtidos, embora as taxas de multiplicação sejam, em geral, inferiores aos sistemas que fazem uso de culturas desorganizadas. Dois tipos de cultura têm sido utilizados, dependendo do tamanho do explant inicial. Assim, a cultura de meristemas, consiste na utilização da extremidade do ápice, constituído exclusivamente por células meristemáticas, com dimensão entre 0.2 e 1 mm, de grande aplicação na obtenção de plantas isentas de vírus (Boxus e Druart, 1986) e a cultura de ápices caulinares, que consiste na utilização de explants iniciais com dimensões que podem ir até aos 10 mm de comprimento. Se as condições de cultivo forem as indicadas para a espécie, ambos os tipos de cultura vão permitir o desenvolvimento de pequenos rebentos. Com tratamentos apropriados, os rebentos assim obtidos podem ser induzidos a desenvolver raízes, concluindo-se assim a obtenção da planta completa ou podem ser utilizados como fonte de obtenção de explants secundários, para assim aumentar o número de rebentos disponíveis para enraizamento e posterior aclimatização.

## 2.1. A micropropagação

De acordo com a terminologia proposta pela Associação Internacional de Cultura de Tecidos, 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).

Foram os trabalhos de Murashige (1974) e posteriormente de Debergh e Maene (1981) que estabeleceram os princípios gerais de um sistema de micropropagação, tendo sido definidas cinco fases: Fase 0: Selecção da planta mãe e preparação do explant; Fase 1: Estabelecimento de uma cultura asséptica; Fase 2: Fase de multiplicação; Fase 3: Preparação para o crescimento em ambiente natural; Fase 4: Transferência para o ambiente natural.

Teoricamente são vários os métodos hoje disponíveis para desenvolver sistemas de propagação *in vitro*. Entre eles podemos referir os sistemas de rebentamento axilar, utilizando como explant primário meristemas, ápices caulinares ou gomos nodais, sistemas de organogénese e/ou embriogénese directa, isto é, directamente do explant e, também por organogénese e/ou embriogénese indirecta, isto é, passando por uma fase de *calli*, podendo depois estes *calli* ser também utilizados para obtenção de culturas de células em suspensão e de protoplastos com posterior regeneração da planta completa.

Estes sistemas têm vindo a obter uma cada vez maior aplicação, quer em espécies herbáceas, quer em espécies lenhosas e o facto de se assistir a uma cada vez maior utilização e aplicação dos sistemas de propagação em geral e de clonagem em particular, segundo metodologias *in vitro*, é testemunho mais do que suficiente para demonstrar as inúmeras vantagens potenciais. (Para conhecimento mais detalhado destes aspectos ver artigo no nº 4 da *Agroforum*)

## 3. Particularidades das espécies lenhosas

É opinião generalizada que existe uma maior dificuldade no estabelecimento de sistemas de propagação *in vitro* de espécies lenhosas do que de espécies herbáceas. Alguns factores que contribuem para tal são a forte influência genotípica inter e intra-específica no tipo de respostas regenerativas, a contaminação das culturas por agentes patogénicos endógenos, a inibição do crescimento por fenóis e polifenóis libertados pelos explants e, finalmente, a dificuldade no estabelecimento em cultivo de explants provenientes de material com características fisiológicas adultas.

Como consequência da forte influência genotípica, é sabido que para cada uma das espécies que se pretende clonar, se torna necessário desenvolver um sistema específico, isto é, o que resulta bem para uma espécie, pode já não funcionar para outra. E em

adição a esta variação interespecífica, assiste-se ainda, por vezes, a uma forte variação intraespecífica de clone para clone. Quando se pretendem desenvolver sistemas para diferentes géneros, estas dificuldades surgem com muito mais relevância.

Também a contaminação bacteriana das culturas *in vitro*, logo na fase de estabelecimento ou posteriormente durante a fase de proliferação, é um grave problema. Tal facto, que pode ser consequência de processos de desinfecção deficientes e, então, há que os corrigir, é muitas vezes resultado de actividade bacteriana endógena, dos próprios tecidos e, como tal, não é possível de eliminar pelos processos de desinfecção normais. Quando tal acontece, há que ter em conta aspectos de sanidade da planta mãe que fornece os explants ou utilizar sistemas de estabelecimento que diminuam esse risco, por exemplo utilizando como explants meristemas ou ápices meristemáticos, sistemas de proliferação que favoreçam o rápido alongamento caulinar com baixas concentrações de citocininas, ausência de luz entre outros e, se necessário, utilização mista destas metodologias associadas ao emprego de antibióticos no meio de cultura.

O terceiro factor, inibição do crescimento por libertação de fenóis para o meio de cultura pelos explants, apesar de na maioria dos casos não poder ser evitado, é possível minimizar os seus efeitos. Assim vários sistemas podem ser definidos tendo por base a remoção dos compostos fenólicos do meio de cultura à medida que vão sendo libertados, a alteração do potencial redox ou, ainda, por redução da actividade das fenolases ou dos substratos. Na prática, alguns destes sistemas têm sido conseguidos através da inclusão no meio de cultura de anti-oxidantes, como por exemplo o ácido ascórbico, o ácido cítrico e o hidrócloro de cisteína ou de substâncias com capacidade de absorção de substâncias fenólicas como o carbono activo ou a polivinilpirrolidina; outra solução consiste na passagem sucessiva do explant por meios líquidos com anti-oxidantes antes de serem colocados no meio de cultura ou, ainda, por transferências sucessivas do explant para novo meio de cultura.

Finalmente, o quarto aspecto referido, dificuldade de estabelecimento de material vegetal de características adultas é, sem dúvida, o que maiores dificuldades tem levantado aos investigadores, em particular em géneros como *Junglans*, *Castanea* e *Quercus*, entre outros, em que a maturidade é atingida muito tardiamente. Por esta razão torna-se necessário utilizar ou desenvolver metodologias que permitam obtenção de material vegetal com características juvenis, sendo as mais utilizadas até ao momento a aplicação de citocininas ao nível da planta ou durante o estabelecimento em cultura, enxertias em série, utilização de rebentos de toça e podas severas (Greenwood, 1986).

No caso da utilização de rebentos obtidos a partir de toças e da base do tronco ou resultantes de podas severas, eles têm sido largamente utilizados, apesar de não se ter ainda perfeito conhecimento se, o aspecto

juvenil dos rebentos é resultado de um processo de rejuvenescimento ou apenas de uma actividade meristemática de tecidos juvenis que permanecem na planta (Greenwood, 1986). Espécies como a *Pinus radiata* L., *Pinus pinaster* L. e *Picea abies* Karst. (St-Claire *et al.*, 1985; Franclet, 1981) nas Gimnospérmicas, têm vindo a ser propagadas com este tipo de material vegetal. Também nas Angiospérmicas, várias são as espécies em que se utiliza este tipo de material vegetal para iniciar sistemas de propagação *in vitro*, como por exemplo castanheiro (Vieitez *et al.*, 1983; Gonçalves, 1991), carvalho (Vieitez *et al.*, 1985) e sobreiro (Manzanera e Pardos, 1990).

A acrescentar a estas dificuldades juntam-se outras, comuns a todas as espécies que são propagadas por estas metodologias, tais como: necessidade de equipamento laboratorial especializado, riscos de contaminação que podem inviabilizar grande quantidade de culturas, desenvolvimento de métodos específicos para cada espécie, o tamanho inicial das plantas é muito pequeno, são muito susceptíveis a perdas de água e, para além de não serem fotossinteticamente autossuficientes, algumas metodologias não garantem estabilidade genética. Perante tudo isto é, assim, indispensável, quando se inicia um projecto de multiplicação de plantas por cultura de tecidos, ter em conta os seguintes pressupostos:

- i) possibilidade de obtenção de taxas de regeneração elevadas;
- ii) capacidade das plantas obtidas *in vitro* resistirem ao transplante e desenvolverem-se no campo, segundo as expectativas ou ainda melhor;
- iii) existir uma certa compatibilidade entre os sistemas adoptados e os sistemas de multiplicação convencionais;
- iv) as características seleccionadas deverão justificar economicamente, ou de qualquer outro modo, o uso de sistemas de propagação por cultura de tecidos.

Com base nestes pressupostos, pretendemos continuar esta apresentação referindo de uma forma sucinta, mas tão actual quanto possível, os aspectos que consideramos mais relevantes das metodologias que hoje são utilizadas para a multiplicação *in vitro* de diferentes espécies vegetais. E como consequência da grande diversidade de técnicas, que resultam das especificidades próprias dos diferentes sistemas culturais, faremos essa apresentação tomando como referência exemplos considerados determinantes para as culturas extensivas, hortícolas, ornamentais, fruteiras e florestais.

#### 4. Culturas extensivas

Como resultado dos significativos acréscimos de investimento que se têm vindo a registar no decorrer das duas últimas décadas na área da biotecnologia vegetal, em particular por grandes instituições de investigação e empresas multinacionais, também as espécies de produção extensiva e das quais depende

em grande parte a própria alimentação humana, quer directa quer indirectamente, têm vindo a sofrer um forte incremento tendo em vista a sua manipulação e obtenção por métodos *in vitro*. Uma das razões que levou os investigadores a só recentemente se dedicarem ao estudo do comportamento destas espécies, quando em condições *in vitro*, deve-se ao facto de elas serem tradicionalmente propagadas por semente (a cana-do-açúcar é excepção). E como é sabido, a obtenção de sementes é, sem dúvida, simples e extraordinariamente barata, pelo que as possíveis estratégias de micropropagação têm necessariamente de ser limitadas às técnicas *in vitro* menos onerosas e com maior capacidade de multiplicação. Para a maioria das espécies essa metodologia é a embriogénese somática.

A pergunta que se coloca é saber como esta tecnologia poderá por si só, ou associada a outras, competir face ao preço de produção de semente por via convencional. Como atrás se referiu, esta apresentação não pretende descrever exaustivamente todo o progresso já feito, pelo que vamos analisar um pouco mais em detalhe duas culturas que se consideram como modelo na aplicação destes sistemas, a luzerna (*Medicago sativa*) e cana-do-açúcar (*Saccharum* spp.).

A luzerna é uma espécie autotetraplóide de polinização cruzada, com acentuada depressão pela consaguinidade. As culturas comerciais são, por isso, produzidas por sementes obtidas de populações sintéticas, nas quais centenas de diferentes genótipos são cruzados a fim de se obter, após algumas gerações, semente certificada, quer para forragem, quer para silagem. O processo leva 3 ou mais anos, durante os quais o grau de heterozigocidade decresce. Até à década de 70 várias tinham sido as tentativas para estabelecer sistemas de propagação vegetativa, em particular para a produção de plantas mãe produtoras de semente (Davies, 1971), no entanto sem assinalável êxito.

A utilização de sistemas de embriogénese somática em luzerna, foi pela primeira vez referidos por Saunders e Bingham em 1972 e, desde então, tem-se registado progressos consideráveis. Os resultados obtidos indicam que através de selecção recorrente, são possíveis de obter elevados graus de regeneração a partir de linhas com fraca capacidade para tal (Brown, 1988), o que de resto não é muito surpreendente, dada a significativa heterozigocidade já referida das cultivares. Estudos recentes, vieram também mostrar que é possível controlar o sistema embriogénico via hereditariedade citoplásmica (Walton e Brown, 1988). Com estes conhecimentos passou a ser possível obter linhas celulares de fraca heterozigocidade, a partir das quais se poderá iniciar um processo de multiplicação em larga escala. Este processo de multiplicação de linhas celulares somáticas em larga escala tornou-se possível através da utilização de bioreactores. Estas máquinas são desenvolvidas por forma a permitirem um controle simultâneo do pH, oxigénio dissolvido no meio de cultura e outros, potencial de oxidação-redução, temperatura e agitação, tendo também possibilidades de substituição contínua de meio. Uma vez conseguido o sistema ideal de

obtenção de embriões, um sistema constituído por géis, nutrientes e uma membrana, pode ser utilizado para encapsular e proteger o embrião, obtendo-se assim, uma completa semente artificial (Fujji *et al.*, 1988), que pode ser mantida até à sua plantação directa no campo, onde os ensaios de avaliação estão já em fase adiantada de implementação.

A previsão para a utilização e divulgação comercial destas sementes artificiais está prevista para os próximos 5 a 10 anos. Poderão ser, assim, rapidamente introduzidas no mercado novas cultivares obtidas pelos métodos de melhoramento convencional ou quase de certeza, como resultado das técnicas de transformação obtidas por engenharia genética (Shahin e Kanaka, 1986).

Em relação à cana-do-açúcar, trata-se de uma espécie de multiplicação vegetativa obrigatória; devido às grandes dimensões dos rebentos de multiplicação, as áreas de viveiros atingem dimensões significativas, com todas as consequências que daí advêm, necessidade de mão-de-obra, tratamentos fitossanitários, fertilizações etc.. Nesta espécie os primeiros estudos foram desenvolvidos na área da regeneração de plantas por organogénese via *callus* (Heinz e Mee, 1969) e recentemente, tornou-se também possível a regeneração de plantas através de embriogénese somática (Ho e Vasil, 1983), com uma estabilidade genotípica bastante significativa.

Um estudo feito pela Associação de Produtores de Cana-do-Açúcar do Hawai, mostrou que a obtenção de plantas por micropropagação é ainda mais cara do que por sistemas convencionais (27 a 16% dependendo do método utilizado). Destes custos, 90% são atribuídos à mão-de-obra. Mas afirmam também, que apesar do maior custo das plantas micropropagadas, esta técnica leva grande vantagem quando se necessita de substituir um campo de plantas mãe, o que se pode traduzir num ganho de 2 anos.

A embriogénese somática associada à tecnologia de sementes artificiais, parece também nesta espécie vir a ganhar cada vez maior consistência, uma vez que, como já foi referido, o factor mão-de-obra é determinante nos sistemas de micropropagação que fazem uso da organogénese e no caso da embriogénese somática ela pode ser fortemente reduzida. Contudo, até ao momento, tal como acontece com muitas outras monocotiledóneas, não existe ainda um eficiente e fiável sistema de produção de embriões somáticos em larga escala.

## 5. Culturas hortícolas

Para o segundo grupo de plantas que referimos, hortícolas, a utilização da cultura de tecidos data desde os clássicos estudos de White (1934). Como resultado de intensos estudos de investigação com estas espécies, têm vindo a ser desenvolvidas uma gama variada de técnicas de micropropagação para a maioria das espécies com interesse económico neste grupo. Muitos destes sistemas envolvem o uso de

tecidos meristemáticos vegetativos, mas também tem sido frequentemente referida a regeneração de plantas a partir de cultura de células e/ou protoplastos. Também neste grupo e para a maioria das espécies, a utilização dos sistemas *in vitro* para obtenção de plantas directamente para a produção, continua a não ser competitiva face aos métodos tradicionais de multiplicação. Isto deve-se, em parte, ao facto de a grande maioria destas espécies serem propagadas por semente. Assim, onde a micropropagação de espécies hortícolas pode, e parece ser um dos seus aspectos mais promissores, sofrer um forte incremento, diz respeito à sua utilização como suporte da tecnologia da produção de sementes, isto é, produção de linhas progenitoras específicas para a produção de sementes híbridas, obtidas quer por melhoramento convencional quer por engenharia genética, como por exemplo em tomate (*Lycopersicon esculentum*), espargo (*Asparagus officinalis*), pepino (*Cucumis sativus*), bróculos (*Brassica oleracea*) entre outras (Doré, 1974; Anderson e Carstens, 1977), para além de casos particulares onde existem grandes dificuldades na aplicação de métodos convencionais, ou no caso das espécies de propagação vegetativa obrigatória, como acontece com a batata.

A manipulação *in vitro* da batateira foi iniciada há já bastante tempo, tendo como grande curiosidade o estudo fisiológico do processo de formação dos tubérculos. De facto, com a manipulação de constituintes e condições do meio de cultura, em particular de citocininas, açúcares, duração do período de luz e temperatura, tem sido possível a formação de microtubérculos cujo peso e número são variáveis segundo as variedades e/ou cultivares (Levy, 1985). Apesar de alguns factores limitantes, tais como dormência e certa fragilidade, estes propágulos são utilizáveis no campo em plantações de grande densidade e com um rendimento que se pode considerar aceitável. Este interesse é tanto maior, pois que, por esta metodologia é possível garantir sanitariamente este material de propagação, na medida em que são eliminados os riscos de contaminações virais, que assumem especial significado neste género, bem como todas as manipulações durante a germinação. A título exemplificativo, uma multiplicação *in vitro* durante um único ano, seguida de 4 anos de multiplicação convencional, permite obter 10 milhões de tubérculos a partir de 10 tubérculos mãe, ou seja 100 vezes mais do que executando todo o processo por multiplicação convencional (Levy, 1985). Assim, é de fácil constatação a importância que este sistema pode assumir no caso de se tratar de tubérculos super elite ou da operação de lançamento de uma nova cultivar.

Também neste grupo de plantas não podemos deixar de referir os importantes avanços que têm vindo a ser registados na obtenção de sementes artificiais, via embriogénese somática e posterior encapsulação, nomeadamente em cenoura (*Daucus carota*) (Kitto e Janick, 1985), aipo (*Apium graveolens*) (Redenbaugh *et al.*, 1986), entre outras.

## 6. Culturas ornamentais

O grupo das ornamentais é, por excelência, o grupo de plantas onde as técnicas de micropropagação tiveram o maior impacto, quer sob o ponto de vista científico quer sob o ponto de vista económico. Tudo isto, provavelmente como consequência do elevado valor intrínseco do produto final por unidade. Este êxito começou em 1960 quando Morel, por razões fitossanitárias, estabeleceu culturas de meristemas de orquídeas, a fim de obter material vegetativo isento de viroses que provocam importantes danos neste género. Como consequência disto foi de imediato constatado o enorme potencial na multiplicação em larga escala deste género que tão grande valor económico tem.

Outro factor que, eventualmente, contribuiu para o sucesso destas metodologias nas ornamentais, tem a ver com a importância que a obtenção de quimeras (plantas constituídas por tecidos de duas ou mais origens, que têm uma coexistência perfeitamente integrada, geralmente provocada por diferenças genéticas) assume nestas espécies, em particular nas ornamentais folhosas, por exemplo a *Ficus benjamina* "Golden King" e "Golden Princess", a *Ficus decora* "Belgaplant", e em géneros como *Cordyline*, *Alpinia*, *Bougainvillea* etc., que podem ser micropropagadas com elevado grau de manutenção destas particularidades. Para nos apercebermos do impacto destas técnicas na multiplicação de ornamentais, apresentamos as seguintes tabelas que traduzem o número de plantas produzidas em cada um dos grupos que referimos (Tabela 1), bem como a sua distribuição por tipos de ornamentais (Tabela 2) e por géneros (Tabela 3).

Neste grupo de plantas é referência obrigatória a orquídea, género *Cymbidium*, mais que não fosse por ter sido a primeira planta a ser micropropagada sob um ponto de vista comercial. A utilização da cultura de meristemas como sistema de propagação clonal vinha assim permitir não só a obtenção de plantas isentas de vírus como também a produção em larga escala, o que de imediato se reflectiu nos preços, tornando estas espécies acessíveis a um maior número de pessoas.

É no entanto importante referir que se têm vindo a registar grandes abusos na aplicação destas metodologias, nomeadamente o não cumprimento das normas técnicas de isolamento de meristemas, o que se traduz em consequências, por vezes dramáticas para os produtores desse material supostamente certificado, contribuindo assim para uma disseminação em larga escala de um certo número de doenças, pelo que, nunca é demais insistir para o cumprimento das normas estabelecidas bem como a indexação periódica do material vegetal produzido.

Em relação às flores de corte, as três espécies mais importantes são o craveiro (*Dianthus caryophyllus*), o crisântemo (*Chrysanthemum morifolium*) e a gerbera (*Gerbera* spp.) que são facilmente propagadas *in vitro* e com elevadas taxas de multiplicação. Estudos recentes em França, apresentam evidências que confirmam as vantagens económicas na produção *in vitro* de craveiro, com ganhos na ordem dos 30 a 40%,

**Tabela 1** - Número de plantas micropropagadas por agrupamento vegetal.

Agrupamentos vegetais	Milhões de plantas
Ornamentais	157.436.792
Fruteiras	19.427.600
Culturas extensivas	2.415.500
Hortícolas	1.377.825
Florestais	1.289.500

Adaptada de Pierik, 1991.

**Tabela 2** - Número de plantas ornamentais micropropagadas em 1988 em 18 países europeus.

Categorias	Milhões de plantas
Plantas de vaso	92.337.417
Flores de corte	37.840.557
Bolbosas	13.161.960
Orquídeas	5.287.990
Lenhosas árvores/arbustos	3.889.290
Perenes de jardim	2.976.050
Várias	1.943.528
Total	157.436.792

Adaptada de Pierik, 1991.

**Tabela 3** - Géneros/espécies mais frequentemente micropropagados.

Género/Espécie	nº países e/ prod. >100.000 pl
<i>Ficus</i>	9
<i>Syngonium</i>	8
<i>Spathiphyllum</i>	7
<i>Gerbera</i>	7
<i>Rosa</i>	6
<i>Philodendron</i>	6
<i>Saintpaulia</i>	6
<i>Nephrrolepis</i>	6
<i>Cordyline</i>	6
<i>Anthurium</i>	3
<i>Cymbidium</i>	3

Adaptada de Pierik, 1991.

para além da garantia fitossanitária, comparativamente aos sistemas clássicos de multiplicação; no entanto a principal saída das plantas micropropagadas continua a ser o fornecimento de material de qualidade para os propagadores convencionais. A erradicação de viroses, no caso do craveiro, nem sempre necessita de termoterapia, já que ela é possível através da manipulação do meio de cultura, embora sempre dependente do tipo de vírus, da cultivar e das técnicas de cultura utilizadas, continuando a vitrificação a ser uma das desordens fisiológicas mais preocupantes quando se utilizam sistemas *in vitro* de multiplicação (Ziv, 1990).

No caso do crisântemo a sua multiplicação em larga escala é possível tanto por caulogénese axilar como adventícia e apesar das potencialidades dos sistemas adventícios serem incomparavelmente maiores em termos de taxas de regeneração, deve-se ter em

conta as desvantagens desta técnica, já que podem induzir instabilidade genética bem como segregação de quimeras, o que poderia trazer como consequência as perdas das características morfológicas que tornam essas cultivares importantes sob o ponto de vista econômico. Estes sistemas adventícios envolvem, por isso, ajustamentos e controles rigorosos dos meios de cultura, durante toda a fase de estabelecimento e multiplicação.

Em relação à gerbera, o maior obstáculo à sua propagação convencional é a relativa baixa taxa de multiplicação, que se traduz em valores da ordem das 7 a 15 estacas por ano, bem como os problemas fitossanitários (principalmente os ataques de *Phytophthora cryptogea*), de tal forma que a multiplicação de gerbera é já, na sua quase totalidade, feita por micropropagação. Estas culturas são iniciadas a partir de meristemas como explants iniciais retirados sem perda da planta mãe, com uma manutenção das características fenotípicas na ordem dos 100%. A principal dificuldade que surge com esta espécie tem a ver com a procura um pouco sazonal deste género, bem como o restrito período de crescimento, o que exige uma criteriosa programação tendo como base o perfeito conhecimento das necessidades do mercado, bem como os parâmetros da multiplicação *in vitro* desta espécie. Nesse aspecto é importante a manipulação dos meios de cultura, em particular das citocininas, já que, por vezes, com a necessidade de aumentar as taxas de multiplicação aumentam-se as concentrações deste regulador de crescimento, podendo provocar alterações ao nível do crescimento e da própria floração, bem como na qualidade geral da planta. Estes aspectos são tanto mais importantes quanto na maioria das situações esta diminuição da qualidade não é passível de avaliação durante a permanência *in vitro* das plantas, vindo-se apenas a manifestar na fase de aclimatização traduzindo-se em reduções drásticas na taxa de sobrevivência.

No grupo das ornamentais folhosas é de destacar o género *Ficus*, no qual a micropropagação teve extraordinário impacto, sendo neste momento a superprodução o principal problema. As médias de produção atingem as 10.000 microestacas por m<sup>2</sup> sendo a sua qualidade boa e de crescimento mais rápido do que as estacas enraizadas pelos métodos convencionais.

Nesta área das ornamentais, um importante avanço no sentido de uma maior redução dos custos de produção, tem a ver com a utilização de sistemas hidropónicos para crescimento das plantas micropropagadas. Estes sistemas têm vindo a ser utilizados por viveiristas, que produzem já plantas por hidropónia como produto final, e que lhes permite assim uma maior rentabilização dos seus equipamentos, tirando todas as vantagens do rápido crescimento das plantas regeneradas *in vitro*, para o seu comércio directo ou então para a obtenção de plantas mãe para a produção de estacas.

Neste grupo existem ainda alguns géneros para os quais não estão ainda definidas as condições ideais de micropropagação, como acontece por exemplo para o bambú, certas coníferas, para os géneros *Paeonia*, *Cyclamen*, o mesmo se passando nas palmeiras ornamentais,

bem como em espécies em que a exsudação de substâncias para os meios de cultura continua ainda a ser um grave problema, como acontece com os géneros *Delphinium*, *Strelitzia* e *Phalaenopsis*.

## Referências bibliográficas

- Ahuja, M. R. (1987) Somaclonal variation. In: Bonga, J. M.; Durzan, D. J. (Eds) Cell and Tissue Culture in Forestry (pp 272-285) Martinus Nijhoff Pub, Dordrecht.
- Anderson, W. C.; Carstens, J. B. (1977) Tissue culture propagation of broccoli, *Brassica oleracea* (Italica group), for use in F1 hybrid seed production. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 102:69-73.
- Boxus, P.; Druart, P. (1986) Virus-free trees through tissue culture. In: Bajaj, Y. P. S. (Ed) Biotechnology in Agriculture and Forestry (pp 24-30) Springer-Verlag, Berlin.
- Brown, D. C. W. (1988) Germplasm determination of *in vitro* somatic embryogenesis in alfalfa. *HortScience*, 23:526-531.
- Davies, W. (1971) Hybrid alfalfa production. U. S. Patent #3,570,181.
- Debergh, P. C.; Maene, L. (1981) A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Sci Hort.*, 14:335-345.
- Doré, C. (1974) Production de plantes homozygotes mâles et femelles à partir d'anthers d'asperge, cultivées *in vitro* (*Asparagus officinalis*). *Compt Rend. Acad. Sci. Paris*, 278D:2135-2138.
- Francllet, A. (1981) Rajeunissement et propagation végétative de lignieux. Annales Afocel (Ed.) (pp.12-39).
- Fujii, J.; Slade, D.; Redenbaugh, K.; Walker, K. (1988) Artificial seeds for plant propagation. *Trends in Biotech.*, 5:335-339.
- George, E. F.; Sherrington, P. D. (1984) Plant Propagation by Tissue Culture. Exegetics Ltd, England (710pp).
- Gonçalves, J. C. (1991) Influência de alguns factores na micropropagação de castanheiro (*Castanea Miller*). Tese de Mestrado. Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa, (113 p).
- Greenwood, M. S. (1986) Rejuvenation of forest trees. *Plant Growth Regulation*, 6:1-12.
- Greshoff, P. M.; Doy, C. H. (1972) Development and differentiation of haploid *L. esculentum* (tomato). *Planta*, 107:161-170.
- Heinz, D. J.; Mee, D. W. P. (1969) Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. *Crop Sci.*, 9:346-348.
- Heller, R. (1953) Recherches sur la nutrition minerale des tissus végétaux *in vitro*. *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg.*, 14:1-22.
- Ho, W. J.; Vasil, I. (1983) Somatic embryogenesis in sugarcane (*S. officinarum* L.): growth and plant regeneration from embryogenic cell suspension cultures. *Ann Bot.*, 51:719-726.
- IAPTC (1985) Usage of Vertebrate, Invertebrate and Plant Cell, Tissue and Organ Culture Terminology. *Newsletter*, 45:15-22.
- Kitto, S. L.; Janick, J. (1985) Production of synthetic seeds by encapsulating asexual embryos of carrot. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 110:277-282.
- Levy, D. (1985) Propagation of potato by direct transfer of *in vitro* proliferated shoot cuttings into the field. *Sci. Hort.*, 26:105-109.

- Lindsey, K.; Jones, M. G. K. (Eds) (1989) *Plant Biotechnology in Agriculture*. Open University Press, Milton Keynes (241pp).
- Manzanera, J. A.; Pardos, J. A. (1990) Micropropagation of juvenile and adult *Q. suber* L.. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 21:1-8.
- Miller, C. O.; Skoog, F.; Von-Saltza, M. H.; Strong, E. M. (1955) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.*, 77:1392.
- Morel, G. M. (1964) Tissue culture: A new means of clonal propagation of orchids. *Amer. Orch. Soc. Bul.*, 33:473-478.
- Murashige, T.; Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol Plantarum*, 15:473-497.
- Murashige, T. (1974) Plant propagation through tissue culture. *Ann. Rev. Plant Phys.*, 25:135-166.
- Pierik, R. L. M. (1991) Commercial micropropagation in Western Europe and Israel. In: P. C. Debergh; Zimmermen, R. H. (Eds.) *Micropropagation* (pp 155-165) Kluwer Acad. Pub.
- Pierik, R. L. M. (1987) *In Vitro Culture of Higher Plants*. Martinus Nijhoff Pub., Dordrecht (344pp).
- Redenbaugh, K.; Paasch, B.; Nichol, J.; Kossler, M.; Viss, P.; Walker, K. (1986) Somatic seeds: encapsulation of asexual embryos. *Biototechnology*, 4:797-801.
- Saunders, J.; Bingham, E. (1972) Production of alfalfa plants from callus tissue. *Crop Sci.*, 12:804-808.
- Shahin, E. A.; Kaneko, K. (1986) Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of nonbulbing onions. *HortScience*, 21:294-295.
- Schenck, R. V.; Hildebrandt, A. C. (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledoneous and dicotyledoneous plant cell cultures. *Can. J. Bot.*, 50:199-204.
- St.-Claire, J. B.; Kleinschmit, J.; Svolba, J. (1985) Juvenility and serial vegetative propagation of Norway spruce clones (*Picea abies* Karst.). *Silvae Gen.*, 42-48.
- Vieitez, A. M.; Ballester, A.; Vieitez, M. L.; Vicitez, E. (1983) *In vitro* plantlet regeneration of mature chestnut. *J. Hort. Sci.*, 58(4):457-463.
- Vieitez, A. M.; San-José, M. C.; Vicitez, E. (1985) *In vitro* plantlet regeneration from juvenile and mature *Quercus robur* L.. *J. Hort. Sci.*, 60:99-106.
- Walton, P.; Brown, D. C. W. (1988) Screening of *Medicago* wild species for callus formation and the genetics of somatic embryogenesis. *J. Genet.*, 67:95-100.
- White, P. R. (1934) Potentially unlimited growth of excise tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiol.*, 9:585-600.
- Ziv, M. (1991) Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: P. C. Debergh; Zimmermen, R. H. (Eds.) *Micropropagation* (pp 45-69) Kluwer Acad. Pub.

\* Biólogo, Prof. Adjunto da ESACB

\*\* Eng<sup>o</sup> Mult. Plantas, Técnica da ESACB