

Sistemas in vitro de multiplicação de plantas: presente e futuro (II)

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, interações 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 quer por 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.

7. Fruteiras

Foi no início da década de 70 que as técnicas de micropropagação, que no campo das ornamentais se afirmavam já como potências concorrentes aos sistemas

convencionais de multiplicação, começaram a ser implementadas ao nível da propagação comercial de fruteiras. A aplicação inicial teve a ver com espécies de pequenos frutos, tais como morangueiro e framboesa, bem como no grupo dos porta-enxertos, em particular de pessegueiro. Estas aplicações iniciais dependiam do valor potencial destas metodologias no que diz respeito às garantias fitossanitárias do material vegetal assim propagado, nomeadamente no que diz respeito à isenção de viroses para o morangueiro e framboesa e, para o caso dos porta-enxertos, para além do aspecto fitossanitário, também o melhor e mais rápido crescimento do material micropropagado. À medida que foram sendo desenvolvidos e aperfeiçoados novos métodos para uma cada vez maior diversidade de espécies, também gradualmente foi aumentando o impacto na aplicação comercial e de especial importância o mercado respeitante à obtenção de cultivares com o seu próprio sistema radicular, evitando assim a enxertia e, como tal, uma mais rápida entrada em produção.

Actualmente, a micropropagação de espécies fruteiras, constitui o segundo maior grupo de produção, depois das ornamentais (Tab. 1), sendo a Itália o maior produtor, logo seguida pelos Estados Unidos, isto no que se refere a fruteiras de climas temperados. Na Tabela 4 indicam-se os valores da produção para 1988 quer de porta-enxertos quer de cultivares com sistema radicular próprio em Itália.

Tabela 4 - Número de plantas micropropagadas em Itália, no grupo das fruteiras, em 1988.

GÉNERO/ESPÉCIE	Porta-enxertos	C/ raízes próprias
<i>Prunus persica</i>	9.787,000	110,000
<i>Citrus spp</i>	2.500,000	-
<i>Malus</i>	400,000	6,000
<i>Pyrus</i>	353,500	870,000
<i>Prunus domestica</i>	280,000	50,000
<i>Prunus avium</i>	215,000	18,000
<i>Prunus armeniaca</i>	140,000	4,100
<i>Actinidia chinensis</i>	100,000	463,000

Adaptada de Pierik, 1991.

Contudo, estes valores de produção alteram-se rapidamente, de acordo com as necessidades e flutuações do mercado, bem como da tecnologia disponível.

Os métodos de micropropagação possíveis para este tipo de plantas são os de rebentamento axilar, adventício e embriogénese somática, mas dentre eles é sem dúvida o de rebentamento axilar o mais utilizado, por razões que anteriormente já foram referidas e que têm a ver com a garantia da estabilidade genotípica do material propagado e que neste grupo assume especial importância. No entanto em algumas espécies, nomeadamente em videira, cultivar "Seyval" (Krull e Worley, 1977) e noqueira (Tulecke e McGranham, 1985), os protocolos de embriogénese somática estejam em rápida definição.

Em relação aos géneros micropropagados tem sido a macieira o mais trabalhado, tendo sido também a produção clonal de porta-enxertos a primeira aplicação comercial. Este facto foi de tal modo importante que durante a década de 70 muitos laboratórios foram construídos especificamente para multiplicar *in vitro* porta-enxertos de macieira, sendo depois alargado o tipo de espécies a trabalhar. Mas também cedo se constataram os custos destas plantas micropropagadas comparativamente a determinados métodos de multiplicação convencional, nomeadamente a amontoa. Como resultado disto, tem-se vindo a registar uma mudança de estratégia por parte das empresas, em particular nos Estados Unidos, deixando estas de produzir plantas para venda directa ao produtor do campo, mas sim produzindo plantas mãe para fornecer aos viveiristas tradicionais.

Outra importante novidade que trouxe a micropropagação de pomóideas foi a possibilidade de obter cultivares com o seu próprio sistema radicular. E apesar de alguns ensaios terem já confirmado algumas potencialidades deste sistema de produção, torna-se ainda necessário avaliar com certo rigor para uma grande maioria de cultivares. Webster e colaboradores publicaram em 1985 os resultados de estudos comparativos entre 4 cultivares de macieira com sistema radicular próprio e enxertadas sobre porta-enxertos M106 e M9. Dos seus resultados deduz-se uma resposta muito genótipo-dependente por parte da cultivar, quer no que diz respeito à produção, quer no porte e desenvolvimento da planta. Nas cultivares em que se assiste a um maior

vigor no crescimento, torna-se necessário o seu controlo através da acção de inibidores de crescimento, como por exemplo a daminozida, que parece também estimular a floração. Depreende-se, assim, que a utilização de cultivares enraizadas em substituição da tradicional associação de porta-enxerto/garfo, continua a necessitar de um estudo mais detalhado e quase caso a caso, mas a ser uma realidade ela só será possível pela micropropagação, como resultado da quase total incapacidade rizogénica das cultivares por parte dos enraizamentos convencionais.

Em relação ao grupo de espécies normalmente englobadas na designação frutos secos, onde se incluem importantes géneros/espécies como a noqueira (*Juglans spp*), a amendoeira (*Prunus dulcis*), o pistácio (*Pistacia spp*), a aveleira (*Corylus avellana*) e o castanheiro (*Castanea spp*) a situação tem, em geral, apresentado maiores dificuldades no que diz respeito à aplicação das metodologias já desenvolvidas à escala comercial, já que estes géneros/espécies têm apresentado certas dificuldades, quer para o seu estabelecimento *in vitro*, quer para as restantes fases da sua micropropagação, de tal forma que só muito recentemente se começaram a ter resultados consistentes. Uma das razões para que tal aconteça, entre outras, tem a ver com o facto do material vegetal para o estabelecimento apenas poder ser obtido a partir de plantas mãe de características fenotípicas já totalmente conhecidas, isto é, com material adulto e, como já foi referido, a utilização de material adulto dificulta todo o processo de rejuvenescimento, característica indispensável a qualquer sistema de multiplicação.

8. Florestais

Por último, mas não menos importante por isso, vamos fazer algumas considerações acerca da aplicação destas metodologias às espécies florestais.

A importância deste grupo de plantas para o nosso planeta é por demais evidente, pelo que é desnecessário fazer considerações. De facto, entre 29 a 34% da área global do nosso planeta é ocupado por florestas. Desta área cerca de 60% são gimnospermas e cerca de 38% angiospermas sendo globalmente admitido que o ritmo de destruição da floresta, por acção do homem, é hoje superior ao ritmo de regeneração, quer natural, quer artificial. Se juntarmos a isto os rápidos e desastrosos efeitos de certas pragas, doenças e incêndios, podemos admitir a situação como muito crítica a médio prazo. Como tal, existe uma urgente necessidade de inverter tal situação, o que só poderá ser conseguido não só intensificando o ritmo de florestação, mas mais do que isso, recorrendo à utilização de espécies melhoradas que possam ser multiplicadas por métodos baratos e rápidos. Actualmente, os programas de melhoramento de espécies florestais, bem como os métodos de propagação clonal disponíveis que permitiriam, assim, reproduzir grande quantidade de plantas com características seleccionadas e expressas de uma maneira uniforme, muito por consequência de vários factores intrínsecos às próprias espécies,

oferecem limitadas condições para se atingirem tais objectivos.

Os benefícios potenciais, e também os riscos, da utilização de plantas clonadas nos programas de florestação têm sido amplamente difundidos, sendo admitidos ganhos na ordem dos 10% comparativamente a plantas obtidas a partir de sementes de famílias seleccionadas (Kleinschmit, 1974). Contudo, é também admitido que, para a obtenção de maiores ganhos genéticos é indispensável a utilização e a compatibilização dos sistemas de propagação sexual e vegetativa. E isto porque, se a reprodução sexual é importante para a introdução de novos genes bem como para ganhos genéticos ao nível das características controladas por genes aditivos, só a reprodução vegetativa permitirá a multiplicação de famílias elite, ou mesmo de indivíduos "plus" dentro da família, que exibam ganhos significativos controlados por genes não aditivos, já que a grande maioria das espécies florestais tende a ser fortemente alogâmica.

Em relação à propagação vegetativa, tema que nos interessa, os tradicionais métodos utilizados com maior rentabilidade, de enraizamento de estacas, de enxertia ou de amontoa, ou são difíceis de conseguir ou são de todo impensáveis quando se fala em termos de milhões de plantas necessárias para florestar. De facto, a estacaria, método que poderia, mesmo assim, permitir obter o maior número de plantas em condições mais baratas, está muito dependente da capacidade rizogénica da estaca que por sua vez é dependente da idade da planta mãe donde é extraída e que, neste caso, terá que ter atingido já a idade adulta. Ora, em geral, a % de enraizamento, a velocidade de enraizamento, o comprimento e o número de raízes, bem como as taxas de sobrevivência ao primeiro e mesmo anos posteriores, decrescem directamente com a idade da planta mãe, em especial a partir dos 10 anos (Greenwood, 1986).

Surge então, com especial importância, a utilização dos sistemas de cultura de tecidos aplicados à multiplicação de plantas em que, como já foi por várias vezes referido, uma das potenciais vantagens tem a ver com os valores das taxas de multiplicação possíveis de obter. Assim, enquanto uma estaca enraizada pode produzir uma única planta, a partir da qual, alguns anos mais tarde, outras estacas poderão ser obtidas, isto se admitirmos o enraizamento por estaca como possível, com as técnicas de micropropagação o número de plantas possíveis de obter altera-se de uma forma altamente significativa. Os trabalhos pioneiros na cultura de tecidos vegetais de espécies lenhosas, iniciados na década de 40, foram desenvolvidos a partir de tecidos cambiais de *Ulmus campestris*, permitindo a obtenção de gemas adventícias (Gautheret, 1940), tendo as primeiras plantas totalmente regeneradas *in vitro* sido obtidas em 1970 por Winton em faia (*Populus tremuloides*) e nas gimnospérmicas por Sommer e colaboradores em 1975 em *Pinus palustris*.

Desde então a multiplicação assexuada de lenhosas utilizando sistemas de cultura de tecidos tem vindo a ser possível por três metodologias: (i) promovendo a quebra de dormência de gomos axilares; (ii) produção

de gomos adventícios; (iii) embriogénese somática. As primeiras duas levam à obtenção de plantas via organogénese através da formação de rebentos unipolares, isto é, só com parte aérea, os quais têm que ser posteriormente enraizados. A embriogénese somática, por seu lado, leva à formação de estruturas bipolares (embrionárias) por uma série de fases em tudo idênticas às de formação de um verdadeiro embrião zigótico. Em relação a estas três metodologias possíveis de utilizar, o seu potencial de produção aumenta proporcionalmente com a ordem de apresentação, tendo no seu conjunto permitido produzir plantas de mais de 70 espécies de angiospérmicas e cerca de 30 espécies para as gimnospérmicas, apesar de para a maioria delas continuar a serem ainda necessários muitos ajustamentos dos diferentes factores intervenientes, por forma a ser possível a sua aplicação em termos comerciais.

Em relação às duas primeiras metodologias referidas, organogénese via rebentamento axilar ou adventício, as maiores dificuldades que se levantam à sua divulgação e concretização tem a ver com a própria manipulação *in vitro* dos explants, que são obtidos de árvores adultas, logo com problemas de juvenilidade/maturidade, com a libertação frequente de substâncias de natureza fenólica a que anteriormente já nos referimos, bem como com a relativa limitação nas taxas de multiplicação que traz implicações ao nível dos custos de produção. Assim, surge mais uma vez a embriogénese somática como metodologia verdadeiramente alternativa e possível de solucionar as dificuldades já referidas para os outros métodos. De facto, as suas vantagens são múltiplas, tais como, ausência de uma fase de indução e desenvolvimento de um sistema radicular taxas de multiplicação incomparavelmente superiores, relembremos a possibilidade de utilização de biorreactores, em que uma célula embriogénica origina uma planta, constitui um verdadeiro sistema de rejuvenescimento o seu armazenamento é altamente simplificado, permite pensar no desenvolvimento de sementes somáticas artificiais para além destas suspensões celulares servirem para sistemas de obtenção de protoplastos que têm utilização directa na aplicação de técnicas de engenharia genética, já que se há grupo de plantas em que mais urgente se torna a redução de tempo necessário para qualquer programa de melhoramento ele é o das lenhosas florestais. E apesar de um cada vez maior número de espécies ser possível de propagar por este método, no entanto e mais uma vez, estas metodologias de embriogénese somática continuam ainda muito ao nível dos laboratórios de investigação. Um dos principais problemas prende-se com a viabilidade dos embriões somáticos obtidos. Por exemplo em *Picea abies*, estima-se que menos de 1% dos embriões induzidos se desenvolvem em plantas completas (Becwar *et al.*, 1989). Contudo o potencial existe, uma vez que os investigadores estimam uma média de 700 embriões por grama de *callus*, o que de facto falta é aumentar esta taxa de viabilidade.

Importantes são também os estudos acerca das performances das árvores no campo. Os dados disponíveis

permitem afirmar que, regra geral, as plantas micropropagadas se apresentam com valores superiores nos parâmetros de avaliação comparativamente a plantas provenientes de sementes (McCown e McCown, 1987), isto para as angiospérmicas, já que para as gimnospérmicas só nos últimos cinco anos se iniciaram estudos comparativos. Em geral, características como a sobrevivência, taxa de crescimento, plagiotropismo e susceptibilidade a doenças têm uma correlação muito directa com a qualidade do rebento-regenerado *in vitro*. Um problema crucial tem sido a qualidade dos sistemas radiculares entre as microplantas e as provenientes de semente e, apesar de se registarem algumas diferenças quantitativas em termos morfológicos (McClelland *et al.*, 1990), cálculos efectuados em função da área radicular, não mostraram diferenças no que diz respeito à absorção de azoto e fósforo (McKeand e Allen, 1984). Também a translocação de ^{32}P e ^{86}Rb é semelhante em microplantas e plantas seminais de *Thuja occidentalis* (Bender *et al.*, 1987).

Outro aspecto importante, e que começa a assumir uma cada vez maior importância em termos comerciais, tem a ver com a produção de pés mãe micropropagados de génotipos "plus", para a posterior obtenção de material vegetativo para propagação por estacaria, estacas estas que se tornam, assim, disponíveis em número significativamente maior, como também apresentam uma muito maior aptidão para a rizogénese.

Resulta de tudo isto que apesar das dificuldades ainda existentes, é inquestionável a importância progressiva que as técnicas de micropropagação têm vindo a assumir no campo florestal. Esta importância é condicionada por factores comerciais e de oportunidade quer a curto prazo quer a médio prazo. A curto prazo a sua aplicação deverá estender-se à multiplicação de génotipos superiores, seleccionados pela qualidade da madeira, de resistência a doenças e a poluentes, tolerância à seca e à geada, quer para plantação directa quer para a produção de plantas mãe, bem como de espécies raras ou ameaçadas de extinção, em que o problema dos custos é amplamente justificado. A médio prazo, a sua aplicação a espécies em que os custos não sejam explicitamente justificados, irá certamente depender do desenvolvimento que os métodos de embriogénese somática vierem a apresentar.

Espécies como o choupo, cerejeira brava, pau-brasil, eucalipto, pinheiro radiata, pseudotsuga, entre outras, são hoje já comercialmente propagadas em muitos laboratórios, estando para breve a comercialização de outras espécies. E de facto os mercados para madeira e derivados estão em franca expansão, o que irá permitir investimentos para a rentabilização dos métodos de micropropagação. Nas angiospérmicas, espécies como o carvalho, nogueira, cerejeira e castanheiro, apresentam-se como essências economicamente viáveis, enquanto que o mercado de papel, de pasta e de madeira a partir de gimnospérmicas está em franco crescimento. Além do mais, no futuro, as intervenções silvícolas serão vistas cada vez mais numa perspectiva de cultura intensiva, diferindo no entanto no que diz

respeito ao período de rotação e à natureza do produto final. Este aspecto, regime intensivo, só será possível através da utilização de árvores superiores e aqui, a aplicação de biotecnologias de melhoramento e propagação terá, sem margem para dúvidas, um papel primordial.

9. Custos da micropropagação

Tal como qualquer outra actividade económica, a multiplicação de plantas por cultura de tecidos a nível comercial tem, como objectivo principal, a obtenção de lucro. Dependente do tipo de empresa, esse lucro poderá ser realizado logo à saída do material vegetal do laboratório, ou então após a sua aclimatização em estufa. E este aspecto é, por si só, determinante nas estratégias comerciais, já que no segundo caso, por exemplo, as preocupações de rentabilidade do produto nas fases intermédias não existem, embora contribuam. Em qualquer dos casos admitem-se quatro pontos como fundamentais, na estratégia de qualquer empresa:

- i) financiamento;
- ii) conhecimento do mercado e condições de acesso;
- iii) investigação e desenvolvimento;
- iv) gestão da produção.

i) **Financiamento.** Na maioria dos casos, a utilização de plantas obtidas *in vitro* está integrada em muitos ramos de negócios hortícolas em sentido lato, e assume tais proporções e competição, que apesar de recentes, só empresas com uma gestão verdadeiramente eficaz vão conseguir sobreviver. Em termos de investimento, importância cada vez maior está a ser dada aos gestores e, em termos de investimento inicial de infraestruturas e equipamentos apontam-se valores de 26 a 39 mil contos, capital este que deverá duplicar nos 5 anos seguintes, daí a importância das condições de financiamento e de gestão, sendo cada vez mais aconselhável que nestas sociedades estejam também envolvidos investidores com conhecimentos na área agrícola e ou biotecnológica.

ii) **Conhecimento do mercado e condições de acesso.** A produção laboratorial deverá constar de um número de espécies e cultivares que sejam consumidas em larga escala e a um preço competitivo. Questões relevantes nesta área são: Quem produz? Como se desenvolvem as plantas nas diferentes fases? Quais os problemas fitossanitários? Regulamento de patentes? Que cultivares podem substituir outras, caso surjam dificuldades? Poderão as plantas obtidas *in vitro* abrir um novo mercado para determinada cultivar? (Outra estação, outro tamanho, menor intervenção, melhores crescimentos, nova apresentação, ...). A possibilidade rápida de resposta a estas e outras questões poderá ser importante no desempenho de qualquer empresa.

iii) **Investigação e desenvolvimento.** Por investigação em laboratórios comerciais entende-se o desenvolvimento quer de aspectos técnico-fisiológicos, como sejam definição de meios de crescimento, métodos de manipulação, condições de crescimento, etc., quer de aspectos relacionados com o planeamento da produção, como sejam cálculos de custos e definição de estratégias para a sua redução, bem como o controle de todos os problemas que vão surgindo durante o decorrer da produção, tais como variações aos resultados esperados, aparecimento de alterações fisiológicas, contaminações etc., ficando de fora, como seria de esperar, a investigação fundamental. Isto não deve, no entanto, significar que a equipa responsável não deva estar bem informada acerca das novas descobertas e isto a um nível para além da simples leitura de publicações científicas, como sejam as participações em congressos, simpósios e colaboração com instituições de investigação.

iv) **Gestão da produção.** Actualmente, a maioria dos laboratórios comerciais produz herbáceas, ornamentais e porta-enxertos, tendo estes grupos de plantas uma significativa importância económica que já foi anteriormente referida. E a gestão desta produção deve ser encarada com base nos conhecimentos do mercado, bem como no perfeito conhecimento das capacidades de produção da empresa e das espécies a trabalhar. É isto porque o desenvolvimento destes sistemas de multiplicação requer a intervenção de vários operadores nas diferentes fases de execução, de meios, de esterilização, de manipulação do material vegetal, para além do conhecimento que se deve ter ao nível das densidades nos frascos de cultura, das condições nas câmaras de crescimento e de todo o processo de aclimatização. É facilmente se compreende a importância destes aspectos se apresentarmos como simples exemplo a preparação dos meios de cultura. Se um operador para preparar 10 litros de meio leva 1 hora, é evidente que a preparação de 20 litros não vai levar 2 horas e no entanto essa quantidade irá permitir multiplicar o dobro de plantas que, evidentemente, deverão ter mercado assegurado.

Considerando que tem sido o elevado custo das plantas obtidas por sistemas *in vitro*, o principal factor condicionante da sua expansão a nível comercial, é compreensível que se venha a registar um forte incremento no desenvolvimento de metodologias e procedimentos que permitam uma acentuada redução desses custos. Estes esforços têm-se centrado na possibilidade de reduzir a componente mão-de-obra, uma vez que ela é responsável por 60 a 85% dos custos totais de produção com maior significado na fase de multiplicação, que deve ser ainda acrescida dos custos de preparação, esterilização e distribuição dos meios de cultura. A redução de custos nesta fase só será possível ou com acréscimos nas taxas de multiplicação ou com a automatização no processo de divisão das culturas. Em relação ao

primeiro aspecto, a manipulação dos suplementos hormonais nos meios de cultura tem-se mostrado bastante limitada, motivo pelo qual se dá hoje mais importância à possibilidade de culturas contínuas, através da substituição automatizada de meio líquido (Tisserat e Vandercook, 1985) e ao controle dos gases ambientais (Kozai *et al.*, 1987), por forma a permitirem a micropropagação sob condições fotoautotróficas, isto é, onde todos os compostos carbonatados sejam derivados da fixação do CO₂ (Kozai, 1991), contrariamente ao que acontece nos actuais sistemas em que eles são obtidos a partir da sacarose adicionada ao meio. Com base nestes princípios, novos equipamentos têm vindo a ser desenvolvidos, como por exemplo o "Mistifier" (Weathers e Giles, 1987), o "Mega-Yield System" de Farrel (1987) e o "Phytocultor System" (Boxus e Pacques, 1987), apresentados na Hortimation Exhibition, Tóquio, em 1988. O segundo aspecto prende-se com o desenvolvimento da robótica. Um destes primeiros protótipos foi desenvolvido em França, por Deleplanque e colaboradores em 1985, o qual podia detectar e transferir plantas de eucalipto. Teoricamente tinha capacidade para transferir 1000 plantas/hora, cerca de 3,6 s/planta, embora não haja publicação de registos na prática. Posteriormente, consideráveis progressos foram conseguidos por um robot construído pela Toshiba Corporation (Fujita, 1989), que permite a detecção, corte e transferência do segmento nodal, num tempo de cerca de 10 s. É provável que a aplicação destes equipamentos e mesmo o aumento das suas performances estejam em franco progresso, mas a informação disponível é muito escassa e vaga, já que estão envolvidos direitos de patentes e de extrema confidencialidade o que é comum a todas as tecnologias de ponta.

Um promissor futuro parece ser a automatização de todo o processo de micropropagação por embriogénese somática. Como já se referiu, a manipulação das suspensões de células ou de propágulos embriogénicos, pode ser processada por biorreactores, restando otimizar a fase de transplante ou de fabrico de sementes somáticas embrionárias.

Finalmente, na fase de aclimatização das plantas regeneradas *in vitro*, a redução de custos está intimamente relacionada com os progressos que estão a ser obtidos no âmbito da mecanização das empresas produtoras de plantas em estufa, bem como na sua colocação no mercado e que podem ser adaptadas para a manipulação das plantas micropropagadas.

10. Nota final

Resulta de tudo o que foi dito que continua a existir um longo caminho a percorrer, para que a aplicação de modernas tecnologias à multiplicação de plantas possa ser largamente divulgada. Este sucesso está directamente dependente da investigação quer ao nível dos factores envolvidos no controlo dos diferentes sistemas de micropropagação, quer ao nível

do melhoramento das espécies vegetais. E, neste campo, que requer significativos investimentos, tempo e tecnologia de ponta, tornam-se ainda necessários muitos estudos ao nível da fisiologia do desenvolvimento das plantas bem como do respectivo controlo molecular.

A concretização destes objectivos torna-se cada vez mais importante se tivermos em consideração que as previsões de acréscimos demográficos para o nosso planeta apontam para uma quase duplicação nos próximos 60 anos, com particular incidência nos chamados países do terceiro mundo, onde se prevê como necessários aumentos da produção na ordem dos 30%.

A produção de alimento, a redução global dos agentes poluentes e a recuperação da integridade do planeta apresentam-se, assim, como os maiores desafios neste quase início do terceiro milénio.

É inquestionável o importante papel que a biotecnologia vegetal deverá desempenhar na resolução de muitos destes problemas, permitindo a obtenção de mais e melhor alimento, contribuindo para a diminuição de poluentes, através da eliminação ou drástica redução da aplicação de pesticidas, herbicidas e fertilizantes, contribuindo para o melhoramento global do ambiente e diminuição do efeito de estufa que deverá resultar de uma reflorestação global em larga escala. E tudo isto para que se não comprometa o direito a uma vivência feliz e saudável por parte das gerações presentes e futuras.

Referências bibliográficas

- Becwar, M. R.; Noland, T. L.; Wyckoff, J. L. (1989) Maturation, germination and conversion of Norway spruce (*Picea abies* L.) somatic embryos to plants. *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 25:575-580.
- Bender, L.; Harry, I. S.; Yeung, E. L.; Thorpe, T. A. (1987) Root histology and nutrition uptake and translocation in culture tissue plantlets and seedlings of *Thuja occidentalis* L. *Trees*, 1:232-237.
- Boxus, P.; Paques, M. (1987) Propagation of woody plants in a culture medium containing hydrolyzed agar to prevent vitrification. Belgian Patent, nº 904661.
- Deleplanque, H.; Bonnet, P.; Portaire, J. P. G. (1985) An intelligent robotic system for *in vitro* plantlet production. *Rovisec*, 5:305-314.
- Farrel, M. A. (1987) Liquid medium system for plant micropropagation. In: Hoet Hennessy (Ed.) *Electronics and Management of Plants*, Paris, 32.
- Fujita, N. (1989) Application of robotics to mass propagation system. *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 2:22-47.
- Gautheret, R. J. (1940) Recherches sur le bourgeonnement du tissu cambial d'*Ulmus campestris* cultivé *in vitro*. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 210:632-634.
- Greenwood, M. S. (1986) Rejuvenation of forest trees. *Plant Growth Regulation* 6:1-12.
- Kleinschmit, J. (1974) A programme for large-scale cutting propagation of Norway spruce. *NZ. J. For. Sci.*, 4:359-366.
- Kozai, T.; Hayashi, M.; Hirosewa, Y.; Kodama, T.; Watanabe, I. (1987) Development of the acclimatization unit for accelerating the plantlet growth and the test cultivation. *J. Agric. Meteorol.*, 42:349-359.
- Kozai, T. (1991) Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: P. C. Debergh; Zimmermen, R. H. (Eds.) *Micropropagation* (pp 447-469) Kluwer Acad. Pub.
- Kurl, W. R.; Worley, J. F. (1977) Formation of adventitious embryos in *callus* cultures of "Seyval", a french hybrid grape. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 102:360-363.
- McClelland, M. T.; Smith, M. A. L.; Carothers, Z. B. (1990) The effects of *in vitro* and *ex vitro* rooting initiation on subsequent microcutting root quality in three woody plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 23:115-123.
- McCown, D. D.; McCown, B. H. (1987) North American hardwoods. In: Bonga, J. M.; Durzan, D. J. (Eds.) *Cell and Tissue Culture in Forestry*, Vol. 3 (pp.247-260). Martinus Nijhoff, Dordrecht.
- McKeand, S. E.; Allen, H. L. (1984) Nutritional and root development factors affecting growth of tissue culture plantlets of loblolly pine. *Physiol. Plant.*, 61:523-528.
- 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.
- Sommer, H.E.; Brown, C.L.; Kormanik, P.P. (1975). Differentiation of plantlets in longleaf pines (*Pinus palustris* Mill) tissue cultured *in vitro*. *Bot. Gaz.*, 136: 196-200
- Tisserat, B.; Vandercook, C. E. (1985) Development of an automated plant culture system. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 5:107-117.
- Tulcke, W.; McGranham, G. (1985) Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledons of walnut, *Juglans regia* L.. *Plant Sci.*, 40:57-63.
- Weathers, P. J.; Gilcs, K. (1987) A novel method of *in vitro* culture adaptable to many varieties of plants. In: Hoet Hennessy (Ed.) *Electronics and Management of Plants*. Paris, 45.
- Webster, A. D.; Oehl, V. D.; Jackson, J. E.; Jones, O. P. (1985) The orchard establishment, growth and precocity of four micropropagated apple scion cultivars. *J. Hort. Sci.*, 60:169-180.
- Winton, L. L. (1970) Shoot and tree production from aspen cultures. *Amer. J. Bot.*, 57:904-909.

* Biólogo, Prof. Adjunto da ESACB

** Eng^o Mult. Plantas. Técnica da ESACB