

PRODUÇÃO DE PLANTAS EM LABORATÓRIO

Moacir Pasqual¹

Renata Alves Lara Silva Rezende²

Filipe Almendagna Rodrigues³

Simone Abreu Asmar⁴

Joyce Dória Rodrigues Soares⁵

A produção de plantas pode ser realizada de forma convencional mediante semeadura em bandejas/saquinhos plásticos ou a partir de partes vegetativas da planta.

No primeiro caso, dá-se o nome de reprodução sexuada à propagação realizada via sementes. As plantas obtidas dessa forma apresentam variabilidade genética entre si, além de longo período para atingir a fase produtiva. Espécies que não apresentam impedimentos na germinação ou aquelas de curto período juvenil são preferencialmente propagadas dessa maneira.

Quando a utilização de sementes é dificultada, diferentes partes vegetativas da planta, tais como caules, raízes e folhas, podem ser empregadas para a propagação de uma espécie, determinando assim a propagação assexuada, ou seja, aquela que não necessita da fusão de gametas. É esse tipo de propagação que será abordado neste artigo.

Inúmeras espécies frutíferas e ornamentais são propagadas usualmente por via assexuada. Essa forma de propagação permite que as plantas formadas sejam idênticas à planta-mãe, ou seja, são consideradas clones. Essa particularidade é muito importante, uma vez que vários caracteres agrônômicos de interesse podem ser mantidos nas plantas, fato que não é observado quando a reprodução é via semente, devido à fusão de gametas e recombinação de genes. A manutenção da informação genética também é importante, pois, as novas plantas formadas possibilitarão a implantação de uma lavoura uniforme, já que todas as plantas são geneticamente iguais. Além disso, a propagação assexuada encurta o período juvenil da planta, ou seja, a planta apresenta redução considerável de tempo para início da produção.

1 Professor titular do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA).E-mail: mpasqual@dag.ufla.br

2 Pós-doutoranda do programa de pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia da UFLA

3 Pós-doutorando do programa de pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia da UFLA

4 Pós-doutoranda do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

5 Professora adjunta do Departamento de Agricultura da UFLA

Porém, esse tipo de propagação também apresenta uma acentuada limitação que consiste na maior possibilidade de disseminação de doenças. Infelizmente, a técnica de se propagar as plantas de forma vegetativa propicia a transmissão de fitopatógenos, o que compromete a produção de plantas e, conseqüentemente, a instalação de um pomar, por exemplo. Uma vez que partes de uma planta atacada por algum patógeno são utilizadas para formar novas plantas, todas as plantas formadas também serão infestadas prejudicando a futura produção.

No Brasil, existem diversas culturas extremamente importantes como fonte de alimento que dependem de propagação assexuada, como é o caso do abacaxizeiro, bananeira, batateira e morangueiro. Todas essas espécies desenvolveram ao longo do tempo mecanismos de produção de novas plantas sem a necessidade da ocorrência de fusão de gametas. Porém, devido à constante ocorrência de doenças por diversos fatores bem como ao surgimento de novas raças de patógenos, os eventos de infecção ficaram mais frequentes. Conseqüentemente, a produção de mudas no campo foi afetada, já que essas plantas, dependentes de propagação assexuada, geravam descendentes também doentes. Assim, a produção de abacaxi, banana, batata e morango tornava-se cada vez mais deficiente.

Mas, a pesquisa foi além e novas alternativas foram estudadas. Como seria a propagação assexuada dessas plantas em condições controladas? Dentro de um tubo de ensaio ou qualquer outro recipiente? E o mais importante: com ausência total de microrganismos patogênicos? Foi a partir de questionamentos como esses que a propagação *in vitro* para essas plantas foi proposta e testada com sucesso.

A propagação *in vitro* ou micropropagação é uma técnica da área conhecida como Cultura de Tecidos Vegetais, pertencente à grande área da Biotecnologia Vegetal. Atualmente, possui ampla aplicação na agricultura, pois por meio dela várias espécies podem ser multiplicadas. Culturas que apresentam problemas de germinação, produção deficiente de sementes e/ou dependência de propagação vegetativa podem, em muitos casos, ser propagadas por meio da micropropagação.

Essa técnica baseia-se no fenômeno da totipotência celular que é a capacidade que uma célula possui de formar uma nova planta com manutenção da informação genética e sem ocorrência de recombinação de genes.

De forma resumida, o processo de micropropagação se dá por meio da coleta de partes da planta (caule, raízes, brotos, folhas etc) que passarão por processo de limpeza para retirada de microrganismos e posterior inoculação em recipientes (tubos de ensaio, frascos) contendo um meio de cultura artificial (Figura 1). Todo o processo ocorre em ambiente asséptico, isto é, sem contaminações. Essa técnica de propagação de plantas, além de proporcionar a produção de clones, também oferece inúmeras outras vantagens como alta taxa de multiplicação em tempo relativamente curto, produção de plantas livres de patógenos, isto é, de alta sanidade, necessidade de pequeno espaço físico e condições ambientais controladas.

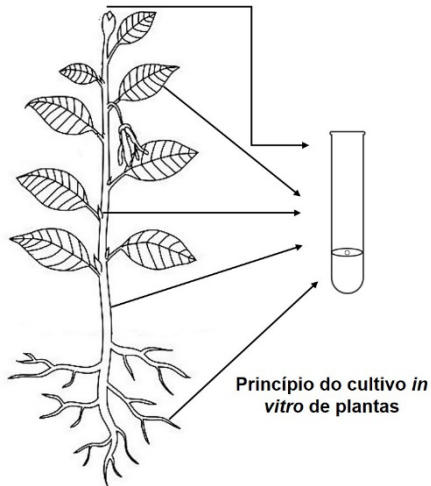


Figura 1. Principais partes da planta utilizadas para dar início ao cultivo *in vitro*.

Foto: Renata A. L. S. Rezende.

A seguir, serão comentados, de forma clara e sucinta, os principais aspectos da propagação feita de forma convencional e *in vitro* de quatro culturas muito importantes no Brasil, sendo elas abacaxi, banana, batata e morango, devido à rica fonte alimentícia que constituem.

Abacaxizeiro

O abacaxi é uma das frutas tropicais mais apreciadas pelo consumidor brasileiro e estrangeiro, constituindo a 6ª frutífera tropical mais explorada economicamente no mundo. Possui significativo valor nutricional devido à presença de vitamina C e minerais como cálcio, magnésio e fósforo. A produção brasileira de abacaxi é crescente, e em 2015 ultrapassou 3,51 milhões de toneladas, com produtividade de 54 t/ha e uma área colhida de 65,2 mil ha (Agrianual, 2016).

As sementes do abacaxizeiro apresentam germinação extremamente lenta, não sendo utilizadas com propósitos comerciais para produção de plantas em larga escala. Assim, a principal forma de propagação da planta é por via assexuada por meio da utilização de diferentes partes da planta. A coroa do abacaxizeiro é um dos tipos de propágulos que pode ser utilizado para produzir novas plantas, mas é menos preferido uma vez que essa estrutura acompanha o fruto que será comercializado para consumo *in natura*. As partes mais utilizadas são conhecidas como filhotes e rebentões que são brotações localizadas na base do fruto e brotações que se desenvolvem a partir de gemas axilares no talo da planta, respectivamente.

Na produção de plantas em viveiros, o tipo de propágulo utilizado pelo viveirista dependerá de sua preferência e da maior ou menor disponibilidade dos propágulos.

Em todo caso, é imprescindível que as plantas produzidas apresentem alta qualidade fitossanitária, pois o sucesso da cultura do abacaxizeiro depende da qualidade da planta utilizada no plantio, ou seja, plantas sadias favorecem produção de frutos de qualidade além de maiores produtividades. Entretanto, os produtores de abacaxi enfrentam um grande problema que acomete a produção de plantas e a qualidade de seus frutos. Trata-se da fusariose, doença causada pelo fungo *Fusarium subglutinans* f.sp. *ananas* que ataca toda a planta ocasionando perdas de cerca de 30 a 40% dos frutos e 20% de plantas (Ventura et al., 2009). Essa doença é tão severa que quando sua ocorrência é constatada na lavoura, recomenda-se eliminar todas as plantas atacadas. O controle com fungicidas é pouco eficiente, pois, na maioria das vezes, as plantas utilizadas na instalação já estavam doentes.

Dessa forma, outra alternativa seria necessária para que a abacaxicultura não fosse mais prejudicada pela ocorrência e transmissão dessa doença nas plantas. Considerando que a fusariose é a doença mais importante do abacaxizeiro no Brasil e se propaga basicamente por plantas contaminadas, pela técnica do cultivo *in vitro* (ou micropropagação) todas as possibilidades de multiplicação desse patógeno se tornam quase que inexistentes quando se empregam plantas sadias produzidas em laboratório (Paula et al., 2015).

Para realização da micropropagação do abacaxizeiro são utilizadas as gemas localizadas nas axilas das folhas (da coroa ou dos filhotes) de plantas-matrizes sadias. Essas gemas são retiradas e passam por um processo de assepsia que consiste na imersão em álcool 70% durante 1 minuto, seguida de imersão em solução de hipoclorito de sódio comercial (até 2% de cloro ativo) durante 15 a 20 minutos. Esses valores podem ser modificados dependendo da cultivar utilizada. O material, então, é lavado 3 vezes em água destilada e autoclavada. Após a limpeza, as gemas são individualizadas e inoculadas em recipientes contendo meio de cultura asséptico. Esse meio irá disponibilizar nutrição adequada bem como água, fonte de energia e hormônios vegetais (reguladores de crescimento), sendo esses últimos, os responsáveis por direcionar o crescimento e desenvolvimento das gemas. Cerca de 50-60 dias após a inoculação, as gemas já apresentam desenvolvimento uniforme com ocorrência de novos brotos os quais serão individualizados e segmentados para dar origem a novas plantas. Esse processo de multiplicação é repetido por algumas vezes. Posteriormente, as plantas são transferidas para recipientes com meio de cultura próprio para alongamento e enraizamento. Após emissão de raízes e alcance de aproximadamente 10 cm de altura, as plantas podem ser retiradas dos recipientes para serem levadas para estufas ou casas-de-vegetação onde se adaptarão ao ambiente externo, fase conhecida como aclimatização.

A utilização da micropropagação em âmbito comercial já é uma realidade na cultura do abacaxi, pois não só garante a produção de plantas em grande escala, como assegura sua fitossanidade e qualidade genética e conseqüentemente maior produtividade, lucratividade e redução no uso de agroquímicos. No Brasil, até o ano de 2012, já existiam 13 biofábricas para produção *in vitro* de mudas de abacaxi (Carvalho et al., 2012).

A micropropagação destaca-se pela produção de elevado número de plantas de abacaxi com características homogêneas e pré-estabelecidas. Quando se compara a produção de plantas em um mesmo espaço de tempo, a cultura de tecidos mostra produção

de maior número quando comparada à propagação convencional. Porém, o maior requisito para que uma cultura se mantenha industrialmente viável é que ela apresente baixo custo de produção, fato que para a cultura do abacaxi ainda não é conseguido pela atual metodologia *in vitro*. Por isso, existem constantes pesquisas que buscam diminuir o custo de produção da cultura via micropropagação, método que ainda possui maior custo quando comparado à propagação feita no campo (Dutta et al., 2013).

Todo o processo do cultivo *in vitro* de abacaxi pode ser visualizado na Figura 2. É importante salientar que este é um esquema geral, existindo outras técnicas que surgiram da modificação deste.

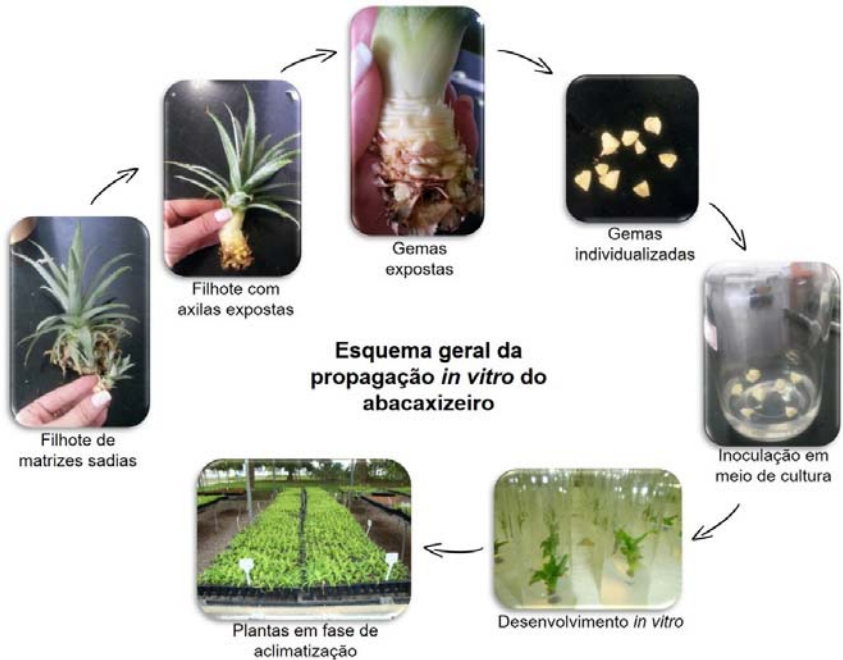


Figura 2. Esquema geral da micropropagação de abacaxizeiro utilizando gemas axilares.

Foto: Renata A. L. S. Rezende.

Bananeira

A bananeira é uma das frutíferas mais cultivadas no mundo e o Brasil encontra-se no *ranking* dos maiores produtores. Em 2015 a produção brasileira alcançou 7,15 milhões de toneladas em uma área colhida de 497 mil há (Agrianual, 2016). A banana assume grande importância para a alimentação básica uma vez que é rica em fonte de energia, minerais (em especial potássio), fibras e vitaminas.

Apesar de algumas variedades produzirem sementes, considera-se a principal forma de propagação da bananeira a que se dá por via assexuada, pois as cultivares

comerciais não possuem sementes. Na natureza, a planta produz diversas brotações (chamadas de filhas e netas) a partir do rizoma, as quais são separadas da planta-mãe e utilizadas em novos plantios. Existem diferentes tipos de plantas as quais se diferenciam pelo porte, tamanho e arquitetura das folhas. Esse processo, apesar de poder ser realizado na própria lavoura evitando assim o gasto com aquisição de plantas, apresenta alguns problemas como baixa taxa de multiplicação, produção de plantas desuniformes em tamanho e idade e disseminação de pragas e doenças, comprometendo a sanidade das novas plantas. Outras formas de propagação já foram testadas para a bananeira, porém, estas ainda esbarram no problema da qualidade fitossanitária das plantas.

Muitas das cultivares mais comercializadas atualmente são suscetíveis a diversas doenças importantes como sigatoka amarela, sigatoka negra, mal-do-Panamá e moko. Isso faz com que a produção de plantas seja afetada, o bananal fique comprometido e, conseqüentemente, a produção de frutos bem como sua qualidade fiquem reduzidos.

Para contornar esse problema, a produção *in vitro* de plantas foi proposta e mostrou-se altamente eficiente para essa cultura, de forma que, hoje em dia, muitos dos bananais existentes foram instalados utilizando plantas produzidas em laboratório.

Todo o processo de micropropagação da bananeira é mostrado na Figura 3.



Figura 3. Etapas da micropropagação da bananeira.

Foto: Filipe Almendagna Rodrigues e Renata Alves Lara Silva Rezende.

Em geral, a micropropagação da bananeira se inicia com a seleção (em campo ou mesmo em casa-de-vegetação) de plantas sadias que fornecerão o material a ser clonado. Após escolha das plantas, as folhas são cortadas e o rizoma junto com parte do pseudocaule são reduzidos e levados para o laboratório. Com auxílio de lâmina de bisturi, o material é novamente reduzido até atingir aproximadamente 5-6 cm, quando então é lavado em água corrente e imerso em álcool 70% e solução de hipoclorito de sódio, seguido da tríplice lavagem em água destilada e autoclavada. Após a limpeza, o material segue para câmara de fluxo onde sofrerá nova redução até que atinja o tamanho de cerca de 2 cm de comprimento. Esse material é chamado de ápice caulinar e é a partir dele que se formará a nova planta. O ápice é inoculado em recipiente com meio de cultura adequado e, com ação de hormônios (reguladores de crescimento) dará origem à novas brotações, as quais serão individualizadas a cada 30 dias. O material, após ser enraizado, é aclimatizado em estufas ou casas-de-vegetação para serem levadas posteriormente para o campo.

A micropropagação tornou-se uma técnica muito utilizada para a produção massal de plantas sadias de bananeira, visando atender com maior rapidez às necessidades dos produtores. No ano de 2012, somavam-se 22 biofábricas de bananeira no País (Carvalho et al., 2012). As plantas produzidas são mais uniformes e precoces quanto à produção além de serem isentas de doenças. A taxa de multiplicação, que pode atingir até 300 novas plantas/planta-matriz em 6 meses, é muito maior quando comparada com a propagação convencional que oferece apenas 30 plantas /planta no período de 1 ano (Alves et al., 1999).

Batateira

A batata é uma solanácea anual de origem andina. Seu produto comercial são os tubérculos que são caules subterrâneos adaptados para reserva e reprodução. Mundialmente, é uma cultura de destacada importância em virtude de seus reflexos socioeconômicos e por constituir a base da alimentação de milhões de pessoas. Cultivada em mais de 125 países, a batata é o 3º alimento mais consumido no mundo, ficando atrás somente do arroz e do trigo. A produção brasileira no ano de 2015 foi de 3,63 milhões de toneladas em uma área colhida de 129,3 mil há (Agrianual, 2016).

A propagação da batata, em escala comercial, é realizada vegetativamente, ou seja, de forma assexuada. No entanto, esse tipo de multiplicação pode permitir o acúmulo de vários fungos sistêmicos, bactérias e infecções virais, que provocam degenerescência na cultura, culminando com perdas de vigor e de produtividade (Lopes e Reifschneider, 1999). Dessa forma, torna-se imprescindível o uso de material propagativo indexado, livre de vírus, com alta qualidade fitossanitária, fisiológica e genética, para garantir que a cultura expresse seu máximo potencial produtivo.

Dessa forma, o emprego do cultivo *in vitro* para produção de material propagativo sadio de batata (batata-semente) se faz necessário. Uma das formas mais eficientes de se propagar batata *in vitro* é por meio do cultivo de seus meristemas e ápices caulinares, técnica que permite a produção de plantas livres de vírus, uma vez que a batata é uma espécie altamente suscetível à viroses. Esse processo se inicia com a coleta de brotações oriundas de plantas-matrizes sadias. Essas brotações

passam por limpeza por meio da imersão em álcool 70% seguida da imersão em solução de hipoclorito de sódio 1,5% com 0,1% de Tween-80. Posteriormente, o material é lavado três vezes com água destilada e autoclavada. Os meristemas são retirados e inoculados em recipientes com meio de cultura específico, sendo o meio líquido muito utilizado. Na Figura 4 podem ser visualizadas as principais etapas do processo de micropropagação de batata. Apesar da comprovada eficiência da cultura de meristemas na erradicação de patógenos, muitas vezes faz-se necessária a combinação desta técnica com tratamentos antivirais para garantir a limpeza clonal.

Cabe salientar que a utilização dos produtos gerados pela pesquisa científica, por parte dos diferentes elos da cadeia produtiva da batata, está na dependência direta de investimentos regulares no setor e na constante capacitação técnica dos profissionais envolvidos. Somente assim a bataticultura será assistida com tecnologia capaz de garantir lavouras altamente produtivas.



Figura 4. Fases da produção de batata-semente por meio do cultivo *in vitro*.

Foto: Multiplanta Tecnologia Vegetal.

Morangueiro

Dentre as pequenas frutas, o morangueiro é a espécie mais cultivada e comercializada. A planta produz um fruto rico em minerais, vitaminas e fibras além de compostos flavonoides que propiciam inúmeros benefícios para a saúde humana. No Brasil, a produção anual de morango gira em torno de 105 mil toneladas em uma área aproximada de 4 mil ha, estando seu cultivo concentrado nos estados de Minas Gerais,

Rio Grande do Sul, São Paulo, Espírito Santo, Paraná, Santa Catarina e Distrito Federal (Reisser Jr et al., 2014). O cultivo desta frutífera demanda elevado contingente de mão de obra, apresentando substancial importância social e econômica, sendo geradora de emprego e renda, principalmente para comunidades de agricultores familiares (Antunes et al., 2007).

A propagação convencional do morangueiro acontece por via assexuada mediante plantio de estolões que são emitidos pela planta-mãe. O estolão é um tipo de caule que forma gemas em pontos intercalados, podendo assim ser utilizados como novas plantas. É comum que os produtores utilizem plantas que já produziram frutos como fornecedoras de estolões. Porém, as novas plantas formadas correm o risco de estarem acometidas por doenças, uma vez que a planta-matriz já está no campo a mais tempo. Isso é problemático pois o morangueiro é uma espécie que sofre com ataque de diversos patógenos, notadamente os vírus.

A utilização de plantas sadias é um pré-requisito para obtenção de maiores produções e de frutos de morango com qualidade superior. Logo, é nesse ponto que novamente surge o cultivo *in vitro* visando produção de plantas livres de doenças.

Plantas-matrizes de morangueiro fornecem os meristemas que, após lavagem e assepsia, serão inoculados em recipientes com meio de cultura já previamente definido. O meristema se desenvolve formando uma nova planta que, em meio de cultura adequado, produzirá novas brotações que serão posteriormente individualizadas e novamente cultivadas. Esse processo de multiplicação deve ser repetido por algumas vezes para otimizar o número final de plantas produzidas. Após essa etapa, as plantas passam por uma fase de enraizamento com posterior transplantio para o meio externo ou podem ser transplantadas como microestacas, ou seja, sem raízes, sendo que estas serão formadas já no ambiente externo. Nesse último caso, uma das fases no laboratório (fase de enraizamento) é eliminada, reduzindo significativamente os custos com a micropropagação. Independentemente da forma de enraizamento, é importantíssimo que sejam tomados todos os cuidados na fase final, que é a aclimatização das plantas em estufas. A transferência das plantas produzidas *in vitro* para as novas condições *in vivo* deve ser conduzida de forma controlada e contínua, possibilitando ajuste gradativo das mesmas às novas condições, de maneira a reduzir os estresses que podem culminar na sua morte.

Na Figura 5 podem ser observadas as etapas do processo de micropropagação do morangueiro.



Figura 5. Etapas da produção *in vitro* de plantas de morangueiro até a frutificação.

Foto: Filipe Almendagna Rodrigues.

No Brasil, foram contabilizadas 9 biofábricas de plantas de morango, distribuídas em vários estados do Sul e Sudeste (Carvalho et al., 2012). O principal entrave para a popularização dessas plantas ainda é o seu custo unitário mais elevado quando comparado ao das plantas tradicionais. Esta é uma grande dificuldade para agricultores familiares que não podem arcar com altos custos de produção. Por questões estratégicas, a produção local de plantas, por uma ou mais empresas ou produtores especializados, deve ser incentivada principalmente para atender uma parte da demanda (Henz, 2010).

Referências

- AGRIANUAL. **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo, 2016.
- ALVES, E.J.; LIMA, M.B.; SANTOS-SEREJO, J.A.; TRINDADE, A.V. Propagação. In: ALVES, E.J. **A cultura da banana**. Embrapa. 1999. 585p.
- ANTUNES, L.E.C.; REISSER JÚNIOR, C. Produção de morangos. **Jornal da Fruta**, v.15, n.191, p.22-24, 2007.
- DUTTA, I.; BHADRA, J.; GHOSH, P.; SAHA, B.; DATTA, S. An efficient and cost effective

protocol for *in vitro* propagation of pineapple. **Journal of Ornamental and Horticultural Plants**, v.3, n.4, p.229-234, 2013.

HENZ, G.P. **Desafios enfrentados por agricultores familiares na produção de morango no Distrito Federal. Horticultura Brasileira**, v.28, n.3, p.260-265, 2010.

LOPES, C.A.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. Manejo integrado das doenças da batata. **Informe Agropecuário**, v.20, n.197, p.56- 60, 1999.

PAULA, Y.C.M.; SILVA, R.A.L.; DIAS, G.M.G.; SOARES, J.D.R. Abacaxi. In: PASQUAL, M.; CHAGAS, E.A (Eds). **Cultura de tecidos em espécies frutíferas**. UFRR, p.13-31. 2015.

REISSER JUNIOR, C.; ANTUNES, L. E. C.; ALDRIGHI, M.; VIGNOLO, G. Panorama do cultivo de morangos no Brasil. **Revista Campo & Negócios**, p. 58-59, 2014.

VENTURA, J.A.; CABRAL, J.R.S.; MATOS, A.P. 'Vitória': new pineapple cultivar resistant to fusariosis. **Acta Horticulturae**, v.822, p.51-55, 2009.



Ilustração: Elen Ravanelli