

Clonagem *in vitro* e caracterização de espécies vegetais

Jacob, A. P.; Grego J. A.; Neves A. M. S
Instituto Politécnico de Santarém, Escola Superior Agrária
S. Pedro 2000 Santarém

Resumo

As técnicas de cultura de tecidos vegetais constituem um processo alternativo na produção de plantas viáveis, de elevada qualidade, inserido em metodologias clássicas de propagação vegetativa, programas de melhoramento, de saneamento vegetal, conservação de germoplasma e obtenção de plantas transgénicas. O conhecimento da fisiologia da cada espécie, sobretudo no que diz respeito às suas particularidades nutritivas, traduz-se frequentemente na necessidade de efectuar estudos para otimizar as condições nutritivas e hormonais para a variedade. Na ESAS, estes estudos reportam-se a 1985 e foram iniciados com o morangueiro, tendo sido produzidas inúmeras espécies das quais se destacam a gerbera, o *limonium*, a noqueira, as orquídeas e a batateira. Apresenta-se neste trabalho um resumo dos estudos efectuados na optimização das condições para a desinfecção do material vegetal a regenerar e para a multiplicação *in vitro* destas e outras espécies.

A necessidade de caracterizar clones, de forma a permitir o estabelecimento inequívoco da sua identidade, levou a que fossem adoptadas metodologias mais precisas e rigorosas relativamente a processos clássicos de caracterização morfológica, só possíveis através do desenvolvimento de técnicas bioquímicas, com especial destaque para as de biologia molecular. A ESAS desenvolveu e aplicou técnicas de análise proteica, enzimática e de DNA na caracterização de espécies comerciais e endémicas de morangueiro, sendo referidos neste trabalho alguns dos resultados obtidos.

CA 12

A possibilidade de identificar e mapear genes torna possível, por seu lado, desenvolver experimentação aplicada para a produção de plantas transgénicas, estando presentemente em fase inicial, na ESAS, uma linha relativa à transformação genética da noqueira.

Introdução

A cultura de tecidos baseia-se em dois princípios – a totipotência, descrita por Haberlandt em 1902, e a possibilidade de regulação hormonal de processos fisiológicos, graças à descoberta das auxinas e das citocininas (Hartmann, 1990), permitindo assim a regeneração de plantas viáveis. O conjunto destas técnicas foi adaptado para a produção de plantas em 1963, na área das ornamentais, com a produção de orquídeas. Desde então, o conjunto de espécies propagadas por estas técnicas é muito diversificado (George *et al.* 1987).

O laboratório de micropropagação da ESAS, desenvolve linhas de experimentação, de acordo com protocolos estabelecidos com empresas viveiristas do sector para a propagação comercial *in vitro* e efectua estudos de

propagação no âmbito de projectos subsidiados (JNICT – morangueiro; PRAXIS – noqueira). Esta capacidade produtiva só é possível após estudos de aperfeiçoamento e desenvolvimento das técnicas de clonagem *in vitro*, inserindo-se neste âmbito trabalhos de estágio de bacharelato e licenciatura. No decorrer destes 14 anos de trabalho, muitos foram os estudos realizados sendo impossível, no âmbito deste trabalho, efectuar um levantamento exaustivo das áreas de estudo, discriminando os aspectos estudados. Desta forma, optou-se por apenas focar os aspectos relativos ao aperfeiçoamento da metodologia de desinfeção do material vegetal a regenerar e dos níveis hormonais utilizados para a proliferação, áreas comuns a todas as espécies propagadas *in vitro*.

CA 12

A análise de proteínas e de sistemas isoenzimáticos, como produtos directos da expressão da informação genética das plantas, constitui uma ferramenta preciosa em estudos de caracterização, como complemento a metodologias de análise morfológica com aplicações vastíssimas, das quais destacamos o estabelecimento de relações filogenéticas, a verificação e estimativa da variabilidade em populações e a identificação e marcação de clones (Orton *et al.*, 1983; Badenes *et al.*, 1991; Dinelli *et al.*, 1992; Roinineu *et al.*, 1992). Na década de 80, este conjunto de técnicas sofreu uma enorme popularidade e a sua utilização só foi reduzida com o avanço da tecnologia de utilização directa da informação genética. Como produto da expressão genética, a análise de proteínas e isoenzimas tem algumas limitações, ultrapassadas quando se analisa e trabalha directamente com o genoma das plantas. Este tipo de análise insere-se nos mesmos domínios das anteriores, acrescentando, no entanto, e com o incremento das técnicas de mapeamento e identificação de genes, novos e poderosos domínios de aplicação, dos quais se destacam a produção de plantas transgénicas (Neves *et al.*, 1991; Jacinto *et al.*, 1992; Dias *et al.*, 1992; Davey *et al.*, 1995).

A ESAS desenvolveu e aplicou este tipo de metodologias, em colaboração com diversas Instituições de Investigação, na caracterização de clones endémicos e em cultivares comerciais de morangueiro, nomeadamente análises de proteínas totais, análise de sistemas isoenzimáticos, e análise do DNA através de RFLPs (Restriction Fragments Length Polymorphism) e de RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA). O estudo de produção de plantas transgénicas decorre actualmente com a noqueira.

Desenvolvimento experimental

1 - Clonagem

O tipo de material vegetal utilizado bem como as suas condições de manutenção (ambientais, substrato, sanidade, idade, etc.) condicionam estudos, muitas vezes bastante extensos no tempo e frequentemente com recurso a um potencial vegetal e humano consideráveis para a aferição do tipo de desinfectante e do processo de desinfeção a utilizar na regeneração de material vegetal.

Apresenta-se no Quadro 1 a metodologia de desinfeção utilizada para a regeneração *in vitro* de plantas. Os explantados usados foram estacas caulinares uninodais, com a excepção do morangueiro onde foram retirados ápices meristemáticos. A concentração dos desinfectantes utilizados bem como o tempo

de contacto com o material vegetal são específicos destas espécies para as condições de manutenção existentes na ESAS.

Quadro 1- Desinfectantes, concentrações e tempos de exposição utilizados na desinfeção do material vegetal para introdução *in vitro*.

DESINF. E CONC.	TEMPOS DE EXPOSIÇÃO			
	7 MINUTOS	10 MINUTOS	15 MINUTOS	20 MINUTOS
HgCl ₂ 0,1%	Ostepermum	Bounganvillea	Limonium	
		Nogueira	Batateira	
		Morangueiro	Oliveira	
		Roseira	Framboesa	
		Kiwi		
HgCl ₂ 0,3%				Gerbera
NaOH 0,5%	St. Paulia	Gardénia		
	Nephrolepis	Craveiro		
	Plumbago			
		Peperomia cap.		
		Hortelã-pimenta		
NaOH 3%		Pelargónio		

De referir que, no caso de algumas lenhosas, como a noqueira, o processo de desinfeção utilizado não ter qualquer influência na eliminação de bacterioses sistémicas, em alguns clones, aspecto este largamente discutido na bibliografia. Salienta-se no entanto, que estas bacterioses, por serem de ocorrência sintomática *in vitro* muito tardia (após seis meses de cultura *in vitro*), complicou todo o esquema de clonagem, devido ao atraso na decisão da não utilização desses clones para a regeneração de material vegetal. O estadio fisiológico da planta e a sua estreita relação com o seu ciclo vegetativo condicionou também muitos dos esquemas de desinfeção apresentados no Quadro 1, podendo-se afirmar que, de uma forma geral, estes esquemas se aplicam para espécies no início do crescimento activo, não sendo eficazes para qualquer outra fase do ciclo.

CA 12

A propagação *in vitro*, quer para a produção comercial quer para a realização de outros estudos (enraizamento e aclimação), sempre se regeu pelos princípios da clonagem, utilizando-se metodologias promotoras da rebentação axilar. O recurso a processos de organogénese não foi utilizado. O tipo e o nível do(s) regulador (es) hormonal (is) utilizado para um binómio nº de plantas produzido/ ausência de calogénese foi estudado e aperfeiçoado através de procedimentos de rotina e de estágios de fim de curso, encontrando-se descrito no Quadro 2. Por vezes, tornou-se necessário proceder a ajustes hormonais na variedade (pelargónio e roseira) ou em função da juvenilidade do material vegetal (proveniência de semente ou de plantas adultas), como é o caso da noqueira (dados não apresentados). A regulação dos níveis hormonais em ciclos de multiplicação a longo prazo torna-se necessária sobretudo para as lenhosas, como a noqueira, para a qual existe necessidade de baixar o equilíbrio hormonal para metade ou mesmo ¼, em ciclos de multiplicação superiores a 1 ano. No caso das herbáceas ou de algumas semi-lenhosas, este problema não se coloca, encontrando-se, por exemplo, a gardénia (semi-lenhosa) em multiplicação ininterruptamente à 8 anos.

Quadro 2 – Níveis hormonais utilizados na promoção da rebentação axilar em diferentes espécies (mg l⁻¹).

Espécies vegetais	Reguladores de Crescimento							
	BAP	2iP	Zeat	GA ₃	IBA	NAA	IAA	Kin
Morangueiro	0.25				0.05			
<i>Limonium</i>	0.6			0.1				
Pelargónio	1.0 0.5		1.0		0.1			
Framboesa	0.5				0.5			
Gardénia	0.5			0.2	0.2			
Bataeira								
Roseira	0.1 1.5				0.1 0.2			
<i>St. Paulia</i>	1.0				0.5			
<i>Nephrolepsis</i>		10.0				0.5		
Gerbera							0.5	10.0
Nogueira	0.25				0.0025			
<i>Kiwi</i>	0.1				0.05			
<i>Peperomia</i>	1.0					0.5		

Para além dos factores hormonais do meio de cultura, não queremos deixar de referir a importância dos factores físicos, os quais assumem especial relevância para a propagação de algumas espécies como a gerbera e a noqueira, onde desvios de temperatura limitam a eficiência da proliferação ou ainda da roseira, onde intervalos de repicagem superiores a 4 semanas induzem o declínio do material e a diminuição da taxa de proliferação.

2 - Caracterização bioquímica e molecular do material vegetal

CA 12

Em colaboração com o Departamento de Genética e Melhoramento Vegetal da Universidade do Algarve, foram efectuados estudos preliminares para averiguação da eficácia da análise isoenzimática e da análise de polimorfismos de DNA na caracterização de 6 variedades comerciais de morangueiro (Irvine; Camarosa; Oso Grande; Cuesta; Chandler; Sweet Charlie). Foram testados 5 sistemas isoenzimáticos (PGM; MDH; IDH; GOT e LAP). Os resultados obtidos não são conclusivos relativamente ao estabelecimento de características diferenciadoras entre as variedades. Na análise por RAPDs, de uma amostragem inicial de 42 iniciadores, foram seleccionados 14 apresentando polimorfismo na caracterização destas 6 variedades de morangueiro.

Em colaboração com o Departamento de Bioquímica da Faculdade de Ciências de Lisboa e com o Laboratório de Genética Molecular do IGC, foram efectuados estudos para averiguar da eficácia da análise de proteínas totais e do polimorfismo de fragmentos de restrição na caracterização de ecótipos de *Fragaria vesca* L, submetidos a diferentes metodologias de manutenção (ao ar livre; em condições ambientais controladas; *in vitro*). A análise de padrões de proteínas totais (SDS-Page, em condições desnaturantes) revelou alterações no padrão proteico, dentro do clone, quando se variava a modalidade de manutenção. A utilização de RFLPs, com recurso a sondas heterólogas de tubulina e ubiquitina não foi conclusivo no estabelecimento de uma completa e inequívoca caracterização dos ecótipos.

3 – Produção de plantas transgénicas

O estudo para a produção de transgénicas em noqueira efectua-se em colaboração com o IBET. No âmbito do projecto PRAXIS – Nogueira, relativo aos

estudos das condicionantes para a sua cultura *in vitro*, e atendendo ao carácter recalcitrante desta espécie, pretende-se estudar a expressão de um gene responsável pela produção de IAA, como alternativa a aplicações exógenas de auxinas, utilizando como vector o *Agrobacterium rhizogenes*.

Referências bibliográficas

Arnold N. P.; Binnus M. R.; Barthakur N.N.; Cloutier D.C. (1992). A study of the effect of growth regulators and time of plantlet harvest on the *in vitro* multiplication rate of hardy and hybrid tea roses. *J. of Hort. Sci.* 67 (6) 727-735.

Badenes M.; Salazar D. (1991). Caracterization bioquímica de variedades de albaricoquero. *Actas de Horticultura, I Cong. Iberico de Ciências Hortícolas. Vol IV: 113-123.*

Conner J. P.; Brows. K.; Weeden N. (1997). Randomly amplified polymorphic DNA – based genetic linkage maps of three apple cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 122(3):350-359.

Davey M. R., Gratland K. M. A. (1995). *Agrobacterium* protocols. Humana Press Inc.

Dias J. C. S. (1992). Taxonomia das couves galaico portuguesas utilizando caracteres morfológicos, isoenzimas e RFLPs. Dissertação para obtenção do grau de Doutor, Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia.

CA 12

Dinelli G.; Bonetti A. (1992). Capillary electrophoresis as an identification tool for *Phaseolus vulgaris* L. cultivars. *Seed Sci. & Technology*, 20:241-249.

Dixon R. A. (1985). *Plant cell culture – a practical approach*. IRL Press Limited.

Evers P. W.; Donkers J.; Prat A.; Vermeer E. (1988). *Micropropagation of forest trees through tissue culture*. Pudor Wageningen.

George E. F.; Puttock D. J. M.; George H. J. (1987). *Plant culture media*. Vol. 1; Vol. 2. Exegetics Limited Edington Westbury.

Jacinto A. A. C. (1992). Contribuição para o estudo dos genes ubiquitina em *Lupinus albus* L. Dissertação fim de estágio. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Neves A. M. G. S. (1991). Estrutura e expressão da família multigénica ubiquitina em *Tetrahynema pyriformis*. Dissertação para grau de Doutor. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Orton T. J.; Tanksley S. D. (1983). *Isozymes in plant genetics and breeding*. Elsevier.

Rafalski A.; Tingey S.; Williams J. G. K. (1994). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Plant Molecular Biology Manual*. 1-8.

Roinineu J. *et al.* (1992). Identification of barley cultivars using SDS-Page electrophoresis. *Agric. Sci. Finl.*, 1:73-81.

Zimmerman R. H.; Degugh P. C. (1991). *Micropropagation – Technologie and application.* Kluwer Academic Publishers.

CA 12