

MICROPROPAGAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS: TREINAMENTO E CAPACITAÇÃO DE ALUNOS DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS NA ÁREA DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL¹

Tatiana Carvalho de Castro², Aline Medeiros Saavedra de Paula³,
Claudia Simões Gurgel⁴, Norma Albarello⁵

O presente projeto foi desenvolvido com o objetivo de capacitar alunos de Ciências Biológicas na área de Biotecnologia Vegetal, especificamente na técnica de micropropagação, que consiste na propagação clonal de um genótipo selecionado. A proposta tem sido desenvolvida há mais de 10 anos no Laboratório de Biotecnologia de Plantas (Labplan). O laboratório atua em diversas linhas de pesquisa na área de Biotecnologia Vegetal, com destaque para a propagação e conservação in vitro de plantas e a produção de metabólitos secundários de interesse medicinal. A micropropagação é uma das principais técnicas de cultura de tecidos vegetais e viabiliza a produção de plantas em larga escala, em espaço reduzido e sem influências ambientais, permitindo o fornecimento contínuo de material botânico para estudos fisiológicos, biotecnológicos e fitoquímicos. Os alunos são treinados em manipulações assépticas e na rotina laboratorial com metodologia variada, consolidando experiência para futuras atividades profissionais.

Palavras-chaves Cultivo vegetal in vitro, planta medicinal, banco de germoplasma.

Introdução

O Laboratório de Biotecnologia de Plantas (Labplan), pertencente ao Departamento de Biologia Vegetal (DBV), foi criado em 1989, sendo o primeiro laboratório a trabalhar com o tema Biotecnologia vegetal na Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Atualmente, integra o Núcleo de Biotecnologia Vegetal (NBV), um grupo de natureza interdepartamental do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG), constituído por seis laboratórios com diferentes linhas de pesquisa na área. O projeto “Micropropagação de Plantas Mediciniais”, premiado na 15ª Semana de Graduação/26ª UERJ sem muros de 2015, teve início em 2001 sob a coordenação da prof^a. Norma Albarello, coordenadora do

¹Trabalho apresentado na 15ª Semana de Graduação/26ª UERJ sem muros de 2015. labplan_uerj@yahoo.com.br

²Supervisora do projeto – Farmacêutica/Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG)/Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)

³Aluna de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal (PGBV)/IBRAG/UERJ, premiada durante a 15ª Semana de Graduação enquanto bolsista de Estágio Interno Complementar.

⁴Bióloga/IBRAG/UERJ

⁵Professora Adjunta/IBRAG/UERJ - Coordenadora do Labplan.

Labplan, e teve ampliação de suas atividades por meio de outros projetos de Estágio Interno Complementar (EIC), contemplando outras linhas de pesquisa em Biotecnologia Vegetal e expandindo o campo de atuação dos alunos de biologia nessa área. Dessa forma, além da linha de micropropagação, o bolsista de EIC tem acesso às metodologias de produção *in vitro* de substâncias bioativas e métodos de conservação vegetal *in vitro*, com importantes contribuições nos projetos de alunos de iniciação científica e de pós-graduação. Além disso, a capacitação de estudantes nas metodologias de cultura de tecidos vegetais de espécies de interesse medicinal contribui no desenvolvimento profissional em uma área que se torna cada vez mais promissora para a conservação da biodiversidade e descoberta de novos fármacos.

Fundamentação teórica

A cultura de tecidos vegetais é um conjunto de metodologias de cultivo *in vitro* de células, tecidos e órgãos vegetais, em condições nutricionais e ambientais controladas, com objetivos específicos (HUSSAIN et al., 2012). Nessas técnicas, pequenos fragmentos de plantas, denominados explantes, são isolados de um vegetal, desinfestados e cultivados assepticamente em meio de cultura apropriado. Essas técnicas são possíveis devido à totipotência, capacidade apresentada pelas células vegetais, que podem ser induzidas a voltar ao estado meristemático e redefinir seu padrão de diferenciação celular, viabilizando, desta forma, a formação de novos órgãos ou de uma planta completa (TERMIGNONI, 2005).

A cultura *in vitro* apresenta diversas aplicações em nível prático como multiplicação de plantas em larga escala, eliminação de vírus, melhoramento genético, conservação de germoplasma e produção de metabólitos secundários (SATHYANARAYANA; VARGHESE, 2007; THORPE, 2012). A produção de substâncias de interesse medicinal tem sido obtida em culturas de órgãos ou de células *in vitro*. Muitas pesquisas têm sido realizadas com plantas de interesse medicinal produzidas por métodos da cultura de tecidos, com investigação comparada dos materiais produzidos *in vivo* e *in vitro* (ALBARELLO et al., 2013).

Os diferentes usos da cultura *in vitro* deve-se ao fato de a célula ou o tecido vegetal poder responder diferentemente, quando submetida (o) a variadas condições

físicas e químicas de cultivo. O crescimento e o padrão de desenvolvimento, na maioria dos sistemas de cultura de tecidos, são influenciados principalmente pela suplementação hormonal ao meio de cultura, que desempenha papel fundamental sobre a resposta inicial do explante. Os principais reguladores de crescimento utilizados em cultura de tecidos vegetais são as auxinas e as citocininas (CALDAS et al., 1998; HUSSAIN et al., 2012).

Dentre as várias aplicações da cultura de tecidos vegetais, encontra-se a propagação vegetativa *in vitro*, denominada micropropagação, que consiste na propagação clonal de um genótipo selecionado (GUERRA; NODARI, 2006). Esta rápida produção de plantas em larga escala, em espaço reduzido, sem influência sazonal, constitui uma importante ferramenta para o fornecimento de material botânico de maneira contínua para estudos fisiológicos, biotecnológicos e fitoquímicos. Essa técnica beneficia a produção de plantas de interesse, em escala comercial, com aplicação na agricultura (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), no comércio de espécies ornamentais (SOUZA et al., 1995), no reflorestamento de áreas degradadas e no reforço de populações (FERMINO-JUNIOR, et al., 2009). A micropropagação permite, ainda, a obtenção de plantas livres de patógenos (GUERRA; NODARI, 2006), o transporte internacional ou regional de germoplasma (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998) e a conservação de genótipos produtores de substâncias bioativas (FRANÇA, 2004). A micropropagação pode ser alcançada, dependendo do material inicial e da resposta morfogenética, através da proliferação de meristemas pré-existentes, da indução de gemas adventícias (organogênese) ou da formação de embriões somáticos (embriogênese). Tanto a organogênese quanto a embriogênese podem ocorrer de maneira direta ou indireta. A via direta envolve a indução de gemas adventícias diretamente nos explantes cultivados em meio de cultura. Na via indireta, ocorre inicialmente uma desdiferenciação celular, formando calos, que são definidos como uma proliferação de células de forma desordenada, e posteriormente, uma rediferenciação celular, originando tecidos (GEORGE et al., 2008).

O presente projeto tem por objetivo o treinamento e a capacitação de alunos de Ciências Biológicas da UERJ em metodologias na área de Biotecnologia Vegetal com ênfase na cultura de tecidos vegetais e nas técnicas de micropropagação.

Proposta metodológica

O uso das técnicas de cultura de tecidos vegetais necessita de alguns requisitos como o investimento em instalações laboratoriais e treinamento de pessoal (HANDRO; FLOH, 1998). Um laboratório de cultura de tecidos vegetais precisa de diferentes ambientes (Figura 1), com instalações e distribuição de suas dependências que permitam uma boa circulação e locais para as operações essencialmente assépticas (TERMIGNONI, 2005). É necessário o treinamento em manipulações assépticas em câmara de fluxo laminar (Figura 2A) e o domínio de equipamentos de esterilização, como autoclave e estufa (Figura 2B), além daqueles relacionados ao preparo de meios de cultura e soluções nutritivas, como balança, pHmetro, placa aquecedora e agitadora, destilador, deionizador, etc (Figuras 2C, 2D, 2E).

Os estudos atualmente realizados no Labplan envolvem a propagação *in vitro* de espécies vegetais produtoras de metabólitos de interesse medicinal, com destaque para as espécies *Annona mucosa* Jacq., *Cleome dendroides* Schult. & Schult. f., *C. rosea* Vahl., *C. spinosa* Jacq., *Hovenia dulcis* Thunb., *Kalanchoe pinnata* Lam., *Mezilaurus navalium* (Allemão) Taub. ex Mez, *Pereskia aculeata* Mill., *Ruta graveolens* L. e *Schwartzia brasiliensis* (Choisy) Bedell ex Gir.-Cañas.

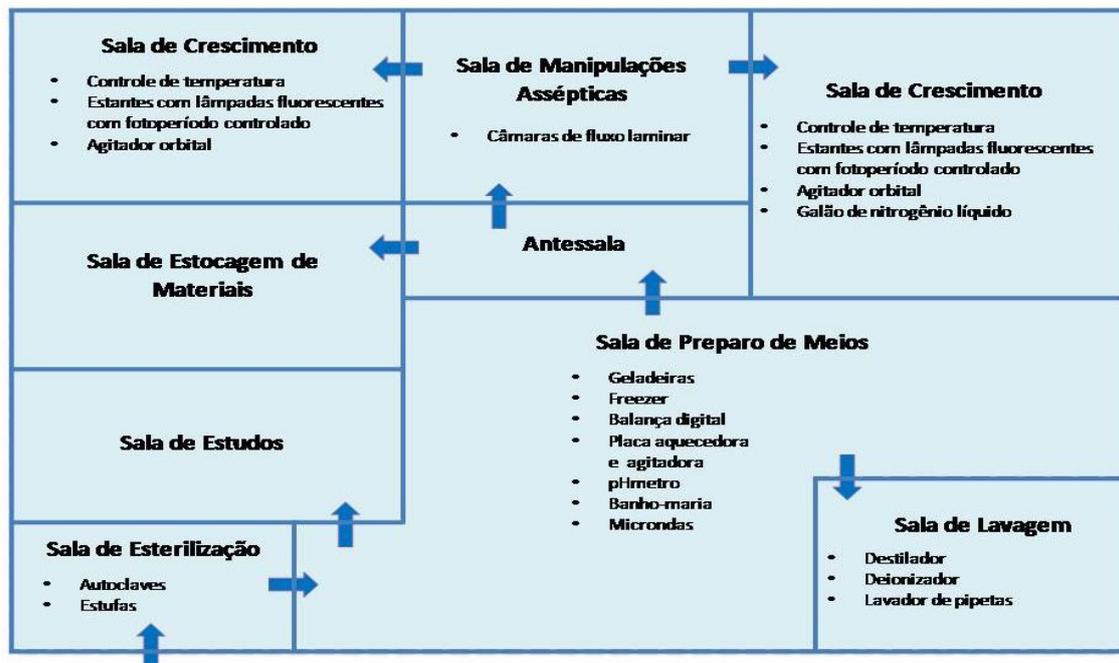


Figura 1: Esquema da organização estrutural do Laboratório de Biotecnologia de Plantas (Labplan) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

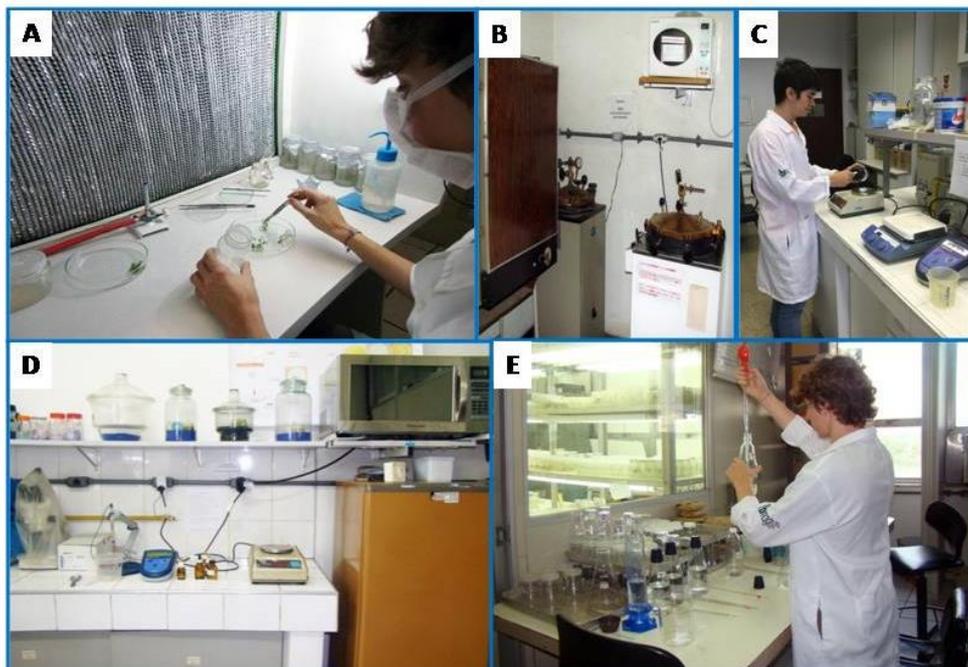


Figura 2: Treinamento de bolsistas de Estágio Interno Complementar da UERJ nas técnicas de cultura de tecidos vegetais desenvolvidas no Labplan.

Usualmente, os estudos de estabelecimento *in vitro* têm início com a coleta das plantas matrizes a campo. Sementes ou órgãos vegetais são descontaminados, frequentemente em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl), seguindo-se lavagem em água destilada estéril. Para os ensaios de germinação sob condições *in vivo*, a semeadura é feita em caixas tipo Gerbox, em diferentes substratos (vermiculita, areia, papel etc). Para a germinação *in vitro*, as sementes são inoculadas sob condições assépticas em meio de cultura, como o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Explantes obtidos a partir das plântulas desenvolvidas *in vitro* ou de órgãos vegetais coletados a campo são inoculados em meios de cultura (sólidos ou líquidos) suplementados com diferentes combinações de reguladores de crescimento, principalmente citocininas e auxinas, para promover a organogênese *in vitro*. Os frascos são mantidos em sala de crescimento, sob condições controladas de temperatura ($26 \pm 2^\circ\text{C}$), luminosidade ($45 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e fotoperíodo (16h). As culturas *in vitro* constituem um banco de germoplasma, o qual serve de fonte de material botânico para futuros estudos biotecnológicos, fitoquímicos e farmacológicos. As etapas de alongamento e enraizamento de brotos obtidos *in vitro* são alcançadas pela inoculação desses materiais em meio de cultura desprovido de

suplementação hormonal (meio MS0) ou suplementado com auxinas, dependendo da espécie vegetal em estudo. Posteriormente, as plantas produzidas *in vitro* são transferidas para recipientes contendo uma mistura de substratos e mantidas sob condições *ex vitro*, com gradual redução da porcentagem de umidade do ar. Esta etapa é realizada no telado do NBV, situado no 6º andar do Pavilhão Haroldo Lisboa da Cunha (PHLC) da UERJ e compreende a aclimatização. Este processo consiste na adaptação das plantas produzidas *in vitro* às condições ambientais.

Resultados

Até o momento têm sido estabelecidos eficientes protocolos de germinação tanto *in vivo* quanto *in vitro* para as diferentes espécies em estudo (Figura 3).

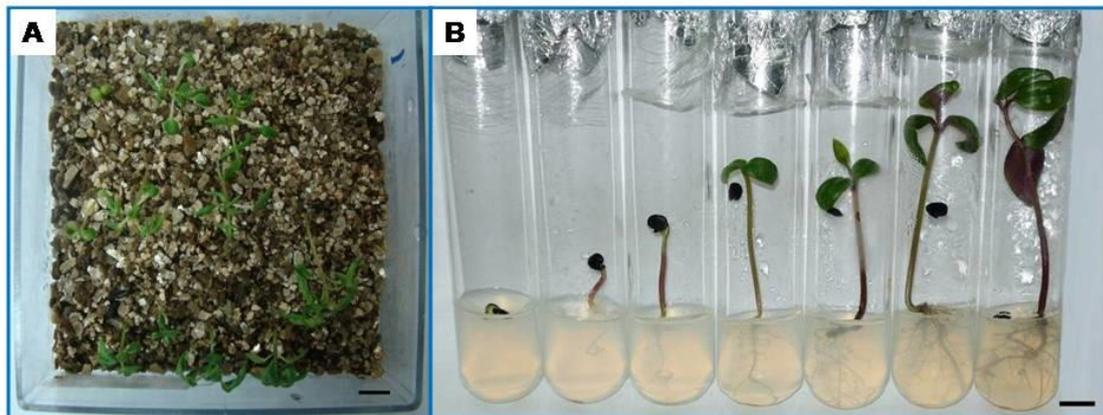


Figura 3: Germinação *in vivo* de *C. dendroides* em vermiculita (A) e germinação *in vitro* de *P. aculeata* em meio MS0 ao longo de sete semanas (B). Barras: 1 cm.

A partir das plantas obtidas por germinação, são isolados diferentes tipos de explantes, de regiões como hipocótilo, epicótilo, folha, pecíolo, raiz. Estes segmentos são inoculados em meio de cultura de formulação básica pré-definida (Figura 4A), suplementado com reguladores de crescimento, isolados ou em combinação, induzindo à formação de gemas e proliferação de brotos via organogênese direta e indireta (Figura 4B).

Para a maioria das espécies em estudo, as sucessivas subculturas dos brotos tem propiciado um aumento gradativo na frequência de proliferação e no número

médio de brotos (Figura 4C), viabilizando a manutenção de estoques de plantas *in vitro* (Figura 4E).

As etapas de alongamento e enraizamento *in vitro* dos brotos têm sido alcançadas satisfatoriamente (Figura 4D), sendo o processo finalizado com a aclimatização (Figura 4F). As metodologias empregadas mostraram-se adequadas para produção de plantas *in vitro* e de mudas.

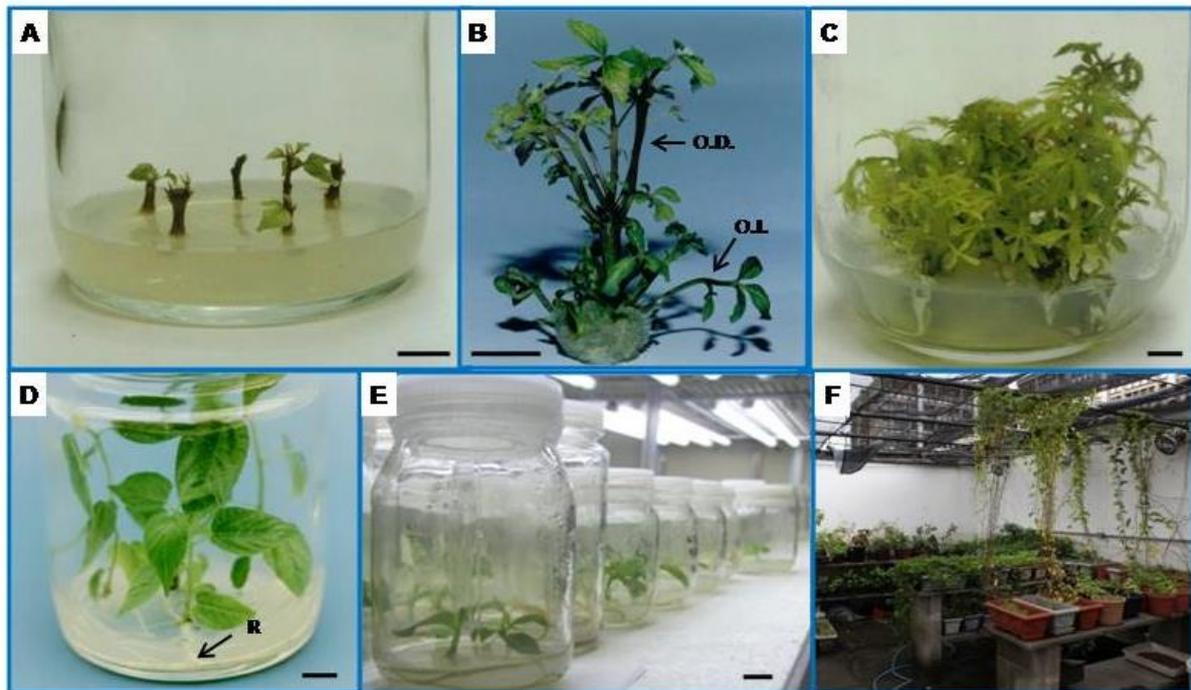


Figura 4: Etapas da micropropagação: A - explantes caulinares de *C. rosea* inoculados em meio MS contendo a citocinina BA; B - produção de brotos de *C. rosea* por organogênese direta (O.D.) e indireta (O.I.); C - multiplicação de *C. spinosa* em meio MS com BA e a auxina AIA; D - alongamento e enraizamento (R) *in vitro* de *H. dulcis*; E - estoque de plantas *in vitro* de *S. brasiliensis*; F - plantas aclimatizadas e mantidas em telado. Barras: 1 cm.

Considerações finais

O projeto “Micropropagação de Plantas Medicinais” tem alcançado sucesso no treinamento de estudantes de graduação do Curso de Ciências Biológicas da UERJ, viabilizando a inserção dos bolsistas de EIC em diferentes linhas de pesquisa, cumprindo a proposta de capacitação na área de biotecnologia vegetal.

Adicionalmente, os protocolos de micropropagação desenvolvidos no Labplan têm apresentado êxito na produção de plantas em larga escala das espécies estudadas.

Agradecimentos: À FAPERJ e à equipe do Labplan, especialmente à Débora de Aguiar Lage e Graziela da Silva Mello pelas fotos cedidas de *P. aculeata* e *S. brasiliensis*, respectivamente.

Referências Bibliográficas

- ALBARELLO, N., SIMÕES-GURGEL, C., CASTRO, T.C., GAYER, C.R.M., COELHO, M.G.P., MOURA, R.S., MANSUR, E. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of fieldgrowth plants and tissue culture of *Cleome spinosa* (Jacq.) in mice. *Journal of Medicinal Plants Research*, v.7, n.16, p.1043-1049, 2013.
- CALDAS, L.S., HARIDASAN, P., FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: SPI/Embrapa-CNPB, v.1, p.87-132, 1998
- FERMINO-JUNIOR, P.C.P., NAGAO, E.O., SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Estabelecimento, germinação e multiplicação *in vitro* de teca (*Tectona grandis* L.f.). *Scientia Agricola - Piracicaba*, V.37, n.84, p.427-435, 2009.
- FRANÇA, S.C. Abordagens biotecnológica para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O., et. al. (Eds.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS, 5 ed., 2004.
- GEORGE, E.F., HALL, M.A., DE CLERK, G.J. *Plant propagation by tissue culture*. 3rd edition. Vol. 1. The background. Springer, The Netherlands, 2008.
- GRATTAPAGLIA, D., MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. (Eds.). *Cultura de tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPB, 1998.
- GUERRA, M.P., NODARI, R.O. *Apostila de Biotecnologia – LFDGV/CCA/UFSC*. Florianópolis: Edição da Steinmacher, 41p. 2006.
- HANDRO, W., FLOH, E.I.S. A Organização de um Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. (Eds.). *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPB, 1998.
- HUSSAIN, A., QARSHI, I.A., NAZIR, H., ULLAH, I. *Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities*. In: LEVA, A., RINALDI, L.M.R. *Recent advances in plant in vitro culture*. 1st edition. InTech, Croatia, 210p. 2012.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.
- SATHYANARAYANA, B.N., VARGHESE, D.B. *Plant Tissue Culture. Practices and new experimental protocols*. I. K. International Pvt Ltd. 316p. 2007.
- SOUZA, J.S.I., PEIXOTO, A.M., TOLEDO, F.F. *Enciclopédia agrícola brasileira: C-D*. Volume 2. Editora EdUSP. 608p. 1995.

TERMIGNONI, R.R. Cultura de Tecidos Vegetais. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 182 p., 2005.

THORPE, T.A. History of Plant Cell Culture. In: SMITH, R.H. Plant Tissue Culture. Techniques and Experiments. Academic Press, Third Edition. 188p. 2012.