



Bases Fisiológicas e Genéticas da REGENERAÇÃO DE PLANTAS *IN VITRO*

Fotos e ilustrações cedidas pelo autor

Um conhecimento útil para o desenvolvimento de protocolos biotecnológicos

Introdução

Apesar da extensa utilização da regeneração de plantas *in vitro* em

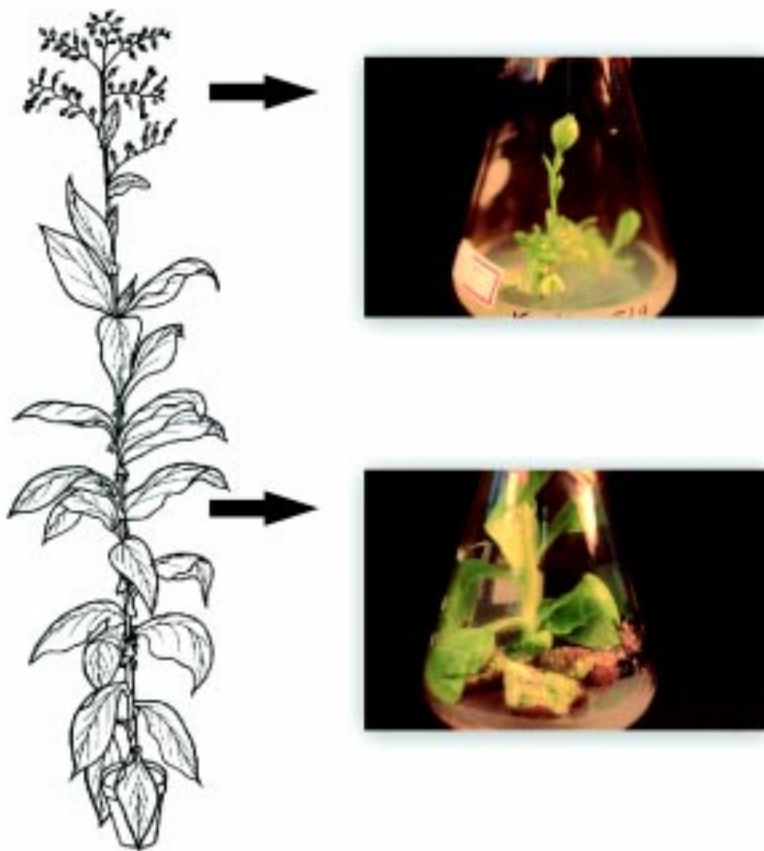


Figura 1. Adaptação do modelo de Tran Thanh Van (1973) para o entendimento da determinação celular. Explantes retirados de regiões reprodutivas estão “induzidos” e “determinados” para originar botões florais, e explantes retirados de regiões vegetativas originam gemas caulinares quando cultivados *in vitro*

Lázaro E. P. Peres
Prof. Dr. – Fisiologia Vegetal – Esalq/USP
Depto. de Ciências Biológicas - LCB
lazaropp@esalq.usp.br
<http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp>

processos biotecnológicos, pouco se conhece, até o momento, sobre os mecanismos envolvidos na aquisição de competência para regeneração. Pode-se dizer que, virtualmente, todos os processos tecnológicos são derivações de conhecimentos básicos adqui-

ridos nos mais variados campos da ciência. A Biotecnologia Vegetal tem seu corpo de conhecimentos amplamente apoiado em estudos de Fisiologia e Genética Vegetal, e, mais especificamente, em uma de suas importantes subáreas – o Desenvolvimento.

O termo desenvolvimento refere-se ao crescimento integrado das várias partes de um ser pluricelular envolvendo basicamente, os processos de divisão, expansão e diferenciação celular e a conseqüente formação de tecidos, órgãos e sistemas. Plantas e animais possuem notáveis diferenças quanto ao tipo de desenvolvimento. Enquanto praticamente todo o desenvolvimento dos animais se processa durante uma etapa denominada embriogênese, nas plantas essa etapa se limita à formação de um eixo contendo os meristemas caulinar e radicular em pólos opostos. Por meio das atividades desses meristemas, as plantas realizam um desenvolvimento pós-embriônico, ou seja, continuam formando órgãos (caules, raízes, folhas, flores e frutos) ao longo de todo o seu ciclo de vida. Esse tipo de desenvolvimento constitui uma estratégia para que os vegetais possam se adaptar às variações no ambiente, já que são organismos sésseis e, portanto, não podem utilizar a locomoção para buscar ambientes favoráveis. Assim, quando um vegetal encontra uma condição desfavorável (p. ex: falta de luz) ele pode lançar mão de seu desenvolvimento flexível para formar novos órgãos (p. ex: ramos e folhas) na direção em que sua sobrevivência e reprodução fiquem garantidas.

Uma das principais características do desenvolvimento pós-embriônico dos vegetais é justamente a separação temporal entre os processos de embriogênese e organogênese. Como se



Figura 2. Exemplo de mutação homeótica em vegetais. A rosa da direita é o resultado de uma mutação homeótica (transformação de um órgão em outro), onde os estames se converteram em pétalas. As diferenças na coloração representam mutações em genes relacionados com a síntese de pigmentos

verá adiante, a separação temporal entre embriogênese e organogênese torna-se relevante quando se procura regenerar plantas *in vitro*, pois o que se faz nada mais é do que tentar reproduzir essas duas etapas em condições artificiais. Sendo assim, como o meristema caulinar pode dar origem a um novo ramo e, nesse, novas raízes podem ser induzidas, é relativamente fácil obter uma multiplicação clonal em plantas. Já nos animais, a propagação clonal é muito rara e em condições artificiais só é possível através de um controle estrito da embriogênese. Como conseqüência, enquanto as plantas são clonadas, desde tempos imemoriais, por processos muitos simples como a estaquia e a enxertia, a clonagem de animais é extremamente difícil e, no caso de mamíferos, só foi obtida recentemente por ocasião do nascimento da ovelha Dolly (Wilnut *et al.*, 1997).

O controle hormonal do desenvolvimento de caules e raízes

Assim como nos animais, o desenvolvimento das plantas é fundamentalmente controlado por substâncias reguladoras de crescimento ou hormônios. Desse modo, apesar de as descobertas feitas até a década de 30, principalmente no campo da nutrição mineral, terem possibilitado o crescimento de órgãos isolados *in vitro* (White, 1934), a indução deles em condições artificiais só foi possível a partir de um conhecimento mais aprofundado acer-

ca da natureza dos hormônios vegetais.

Durante a década de 50, a equipe do Dr. Folk Skoog fez descobertas que foram fundamentais para a indução e manutenção da organogênese *in vitro*. Naquela época já se conhecia o ácido indolil-3-acético (AIA), uma auxina isolada em 1934. O AIA era utilizado em meios nutritivos juntamente com constituintes complexos, como extrato de levedura e água de coco, os quais pareciam conter algo também essencial à organogênese. Essa substância essencial para a divisão celular foi finalmente isolada por Carlos Miller em 1955 e denominada citocinina. A chamada citocinina, assim denominada por promover, juntamente com a auxina, a citocinese, propiciou, finalmente, as bases da organogênese *in vitro*. Desse modo, em 1957, Carlos Miller e Skoog demonstraram que a formação de dois órgãos *in vitro*, caules e raízes, era controlada pelas concentrações relativas entre auxina e citocinina. Meios de cultura contendo um balanço auxina/ citocinina favorável à auxina promoveram a formação de raízes em calo (um aglomerado de células) de tabaco (*Nicotiana tabacum*). De modo inverso, balanços hormonais favoráveis à citocinina fizeram com que fossem formadas gemas caulinares. Finalmente, balanços hormonais intermediários não levaram a uma diferenciação das células e sim a uma maior multiplicação delas e conseqüente crescimento do calo (Skoog & Miller, 1957). Apesar desses resultados terem

sido obtidos ainda na década de 50, eles são plenamente corroborados em trabalhos mais recentes, onde se altera o conteúdo endógeno de auxina e citocininas em plantas transgênicas expressando genes bacterianos para produção desses hormônios. A exemplo disso, plantas de tabaco expressando o gene *ipt* de *Agrobacterium tumefaciens* possuem elevado nível endógeno de citocininas e a conseqüente intensa formação de gemas caulinares *ex vitro* e *in vitro*. De modo inverso, a expressão dos genes bacterianos *iaaHe iaaM*, envolvidos na biossíntese de auxina, provoca ampla formação de raízes em plantas transgênicas. Surpreendentemente, quando se cruzam os dois tipos de transgênicos, o híbrido F1 tende a apresentar fenótipo igual ao tipo não transgênico. Esses estudos confirmam os resultados de Skoog e Miller (1957), os quais postularam que as concentrações absolutas de auxina e citocininas são menos importantes que suas concentrações relativas na indução de organogênese.

Diferenças entre organogênese e embriogênese *in vitro* e tipos de organogênese

Como dito anteriormente, o desenvolvimento das plantas é dividido entre organogênese e embriogênese, sendo que essa característica se reflete no processo de regeneração *in vitro*.

A princípio, a formação de embriões a partir de tecidos somáticos *in vitro* imita a embriogênese zigótica, que ocorre nos órgãos reprodutivos das plantas. Desse modo, tanto a embriogênese somática quanto a zigótica culminam na formação de uma planta inteira a partir de uma única célula. Contudo, em certos explantes, os embriões somáticos formam-se a partir da diferenciação conjunta de grupos de células embriogênicas (Williams & Maheswaran, 1986). Como a organogênese normalmente envolve a regeneração de gemas a partir de grupos de células meristemáticas, há casos em que é difícil determinar se o processo de regeneração envolve organogênese ou embriogênese. Alguns critérios para a determinação do tipo de regeneração são apresentados a seguir:

- I. os embriões somáticos possuem sistema vascular fechado sem conexão com o

sistema vascular do explante inicial, como ocorre na organogênese;

II. a estrutura formada na embriogênese é bipolar (eixo com os meristemas caulinares e radiculares). Na organogênese são formadas gemas caulinares que, mais tarde, darão origem a raízes adventícias.

Nos dois processos de regeneração, há necessidade do estabelecimento de células competentes no explante inicial. Tanto as células meristemáticas, que darão origem às gemas caulinares, quanto as células embriogênicas

A obtenção de organogênese *in vitro* é atualmente um processo empírico onde são testados para cada espécie, ou mesmo para cada variedade dentro de uma espécie, as seguintes condições: I) fonte de explante; II) composição mineral do meio de cultura (e também suas vitaminas e fontes de carbono); III) balanço hormonal e IV) condições ambientais.

Embora seja um processo empírico, o desenvolvimento de um protocolo para organogênese *in vitro* será facilitado, e, inclusive, o número de variáveis a serem testadas diminuirá, se forem seguidos alguns princípios e conhecimentos fisiológicos. Desse modo, quanto à fonte de explante,

gemas caulinares.

Diferenças significativas na capacidade organogênica *in vitro* são encontradas ao se variar a composição mineral, as vitaminas e as fontes de açúcares dos meios de cultura. Contudo, os componentes mais críticos adicionados ao meio de cultura são os hormônios vegetais. Como foi visto anteriormente, os principais hormônios utilizados na organogênese são as auxinas e as citocininas. Outras classes de hormônios vegetais, como as giberelinas, o etileno e o ácido abscísico ou mesmo substâncias que não sejam propriamente hormônios, como poliaminas, ácido salicílico e jasmonatos também são, muitas vezes, utilizados em processos de regeneração por organogênese. Existe considerável número de evidências de que o efeito dessas substâncias é indireto, através da alteração do balanço auxina/citocinina endógeno. O próprio efeito das auxinas e das citocininas aplicadas ao meio de cultura parece ser, na verdade, o reflexo dessas substâncias alterando os balanços endógenos de auxina/citocininas nas células vegetais (Peres *et al.*, 1999). Esse efeito indireto é, inclusive, muito comum quando se utilizam auxinas sintéticas, como o 2,4 D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético), o ANA (ácido naftaleno acético), ou citocininas sintéticas como a benzilaminopurina (BAP), a cinetina e, sobretudo o thidiazuron. Essa última "citocinina" não possui a estrutura comum das citocininas, sendo um difeniluréia ao invés de possuir um anel purínico característico do BAP, da cinetina, da isopentenil adenina (iP) e da zeatina (Z). Trabalhos realizados por Van Staden e também por David Letham fornecem evidências de que o thidiazuron pode atuar inibindo a enzima citocinina oxidase, a principal enzima envolvida na degradação de citocininas endógenas como Z, iP e seus derivados.

Finalmente, as condições ambientais influenciam notavelmente a organogênese *in vitro*. Normalmente as salas de cultivo são mantidas em temperatura ambiente (25° C), sendo a luz o fator ambiental que parece mais afetar a organogênese. Muitos protocolos de regeneração são conduzidos no escuro, sobretudo para evitar a oxidação do explante na fase de estabelecimento. Esse procedimento se baseia no fato de a enzima chave da



Figura 3. Diferenças genéticas quanto à capacidade de regeneração em espécies de *Lycopersicon*. A – raiz gemífera de *L. hirsutum*. A capacidade de formar gemas caulinares em raízes *ex vitro* se reflete na competência para regeneração *in vitro* a partir desse tipo de explante (Peres *et al.*, 2001). B – Elevada capacidade de regeneração de *L. pimpinellifolium* WV700 a partir de explantes caulinares, a qual é controlada por dois genes principais (Faria & Illg, 1996)

podem se formar posteriormente ou podem estar preexistentes no explante. No caso do explante já possuir células meristemáticas ou embriogênicas, ocorrerá organogênese direta e embriogênese direta, respectivamente. Quando há necessidade de desdiferenciação do explante, com a consequente formação de calo prévia ao estabelecimento das células competentes, ocorrerá organogênese ou embriogênese indireta. Por simplificação, a seguir iremos considerar somente o processo de organogênese *in vitro* (Consultar a Revista Biotecnologia Ed. 7 para mais informações sobre embriogênese somática).

O processo de indução e manutenção da organogênese *in vitro*

normalmente haverá maior sucesso se forem utilizados tecidos jovens, os quais possuem maior competência organogênica. Explantes que contêm tecidos meristemáticos são preferidos e eles são encontrados em gemas caulinares apicais e axilares. Uma ampla fonte de tecidos meristemáticos, normalmente negligenciada, são as raízes, as quais possuem tecidos meristemáticos nos ápices, além de o próprio periciclo ser um tecido meristemático. O fato de as raízes estarem em contato com o solo torna impraticável sua desinfestação, sendo elas utilizadas somente a partir de plantas preestabelecidas *in vitro*. Outro fator limitante é que algumas espécies parece ter raízes com extrema determinação para continuarem se desenvolvendo como raízes, sendo difícil nelas a formação de

produção de compostos fenólicos, a fenilalaninamonioliase, ser dependente da luz. A luz afeta a morfogênese de modo mediado por fotoreceptores como o fitocromo. Um experimento que evidencia a relevância da fotomorfogênese na organogênese *in vitro* é a constatação de que o mutante *aurea* de tomateiro, o qual é defeitivo para o gene que codifica uma enzima na formação do cromóforo do fitocromo, praticamente não forma gemas *in vitro* (Lercari et al., 1999).

Apesar de serem seguidos princípios básicos e de se testarem empiricamente diversos parâmetros, muitas vezes não se consegue a organogênese *in vitro*. Os fatores associados a esse insucesso serão discutidos a seguir.

Fatores associados à falha na indução de organogênese *in vitro*

Christianson & Warnick dividiram o processo de organogênese *in vitro* nas seguintes etapas: 1) desdiferenciação; 2) aquisição de competência; 3) indução; 4) determinação; 5) diferenciação e 6) formação do órgão (Christianson & Warnick, 1988). Essa divisão do processo em etapas permitiu a esses autores postularem que, quando um explante falha em desenvolver organogênese *in vitro*, essa falha se dá normalmente na etapa de aquisição de competência. Contudo, pouco se conhece, até o momento, sobre os mecanismos envolvidos na aquisição de competência para organogênese (Kerbauy, 1999).

A aquisição de competência para organogênese

No processo de organogênese, a competência seria entendida como a capacidade de responder ao estímulo hormonal necessário à indução da formação do órgão. A falha de competência de um tecido poderia refletir, portanto, a falta de receptores para a classe hormonal que irá induzir o processo organogênético (Carry et al., 2001). Os recentes estudos relacionados com o isolamento de genes correspondentes a receptores, principalmente de citocininas (Inoue et al., 2000), certamente contribuirão para um melhor entendimento do processo de aquisição de competência organoge-

nética.

Um outro fator associado à falta de competência organogênética seria o próprio metabolismo hormonal do explante, pois é ele que determinará, em última análise, o balanço hormonal endógeno para indução da organogênese (Peres & Kerbauy, 1999). Desse modo, explantes com alta atividade de citocinina oxidase, enzima que degrada citocininas, podem não chegar a um balanço auxina/citocinina endógeno indutor da formação de gemas, mesmo que sejam adicionadas elevadas concentrações de citocininas ao meio de cultura. De modo semelhante, explantes com elevada atividade de degradação oxidativa ou de inativação de auxina por conjugação com açúcares e aminoácidos podem falhar na indução de raízes adventícias. O efeito diferencial dos vários tipos de auxinas e citocininas quando aplicados ao meio de cultura pode ser também correlacionado com o fato de cada um deles interferir de modo particular no metabolismo hormonal endógeno.

Finalmente, explantes comprometidos para vias particulares de desenvolvimento (elevada determinação para formar um órgão específico) podem falhar na alteração dessa via para assumir uma outra. Um estudo clássico sobre determinação celular foi apresentado por Mary Tran Thanh Van ao demonstrar que explantes epidérmicos de pedúnculo floral de tabaco tendem a formar novas flores *in vitro* (Tran Thanh Van, 1973; Fig. 1). De modo geral, pode-se dizer que, quanto maior for a determinação de um explante para uma via de desenvolvimento (por exemplo, a formação de raízes) menor será a competência para formar outro tipo de órgão (por exemplo, gemas caulinares). Um exemplo de tecido com baixa determinação e elevada competência tanto para formação de raízes quanto de



Figura 4. Reinterpretação da hipótese proposta por Christianson & Warnick (1988) para o entendimento da competência organogênética. Os possíveis estágios onde atuariam diferentes genes que influenciam a regeneração são indicados em vermelho. Os “genes de sensibilidade” seriam aqueles envolvidos na percepção (codificação de receptores) e transdução do sinal para auxinas (AIA, 2,4D) e citocininas (Cks). Os genes de metabolismo hormonal (que codificam enzimas de biossíntese e/ou degradação de hormônios) são os responsáveis pelo estabelecimento de um balanço hormonal endógeno necessário para a regeneração. Genes homeóticos controlam a formação de órgãos e, portanto, podem estar associados à regeneração de novas gemas caulinares ou raízes. A expressão desfavorável de qualquer uma dessas classes de genes seria suficiente para impedir a regeneração de um determinado explante

gemas caulinares é o calo. O calo é considerado um tecido indiferenciado, ou pouco diferenciado, podendo ser induzido, tornando-se determinado e, finalmente sofrer diferenciação para formar gemas caulinares ou raízes, conforme o balanço hormonal aplicado (Skoog & Miller, 1957). Tanto a aquisição de “competência” quanto a “determinação” são reflexos da expressão diferencial de genes envolvidos nos processos de desenvolvimento. Resta saber, portanto, que tipo de genes seriam esses.

Genes envolvidos na capacidade de regeneração *in vitro*

Como visto acima, a regeneração de um explante depende tanto da sensibilidade quanto do metabolismo para uma determinada classe hormonal. Desse modo, genes associados à capacidade de regeneração poderiam ser os próprios genes que codificam componentes da via de transdução de sinal ou as enzimas do metabolismo hormonal. Além disso, para que um tecido se diferencie em um determinado órgão, faz-se necessário que ele possua a capacidade de expressão dos chamados “genes mestres”, que coordenam a expressão dos vários genes que serão requeridos durante a organogênese. Nesse sentido, explantes que falham em formar um determinado órgão *in vitro*, por estarem “determinados”, podem ter perdido a capacidade de expressão de “genes mestres” durante um processo intenso de diferenciação sofrido anteriormente. Um exemplo de gene mestre que pode estar relacionado com a capacidade de regeneração é *KNOTTED1* (Smith et. al., 1995), o qual se expressa em caules, mas não em explantes radiculares. O gene *KNOTTED1* é considerado um gene homeótico, uma classe de genes que, ao sofrerem mutação, podem provocar a formação de órgãos em locais não convencionais. O primeiro gene homeótico descoberto foi *ANTENNA-PEDIA*, um gene da mosca *Drosophila*, cuja mutação provoca formação de pernas na cabeça no lugar das antenas. Em plantas, uma mutação equivalente é a transformação de estames em pétalas, produzindo as conhecidas rosas dobradas (Fig 2).

É interessante notar que em certas espécies existem diferenças na capacidade de regeneração *in vitro* que são controladas por poucos genes. Um modelo promissor é o tomateiro (*Lycopersicon esculentum*), cuja alta capacidade de regeneração de algumas espécies selvagens (Fig. 3) parece ser controlada por um ou dois genes dominantes (Koornneef et al., 1993; Faria & Ilgg, 1996; Peres et al., 2001). Infelizmente, ainda não temos informações acerca da função de tais genes. Contudo, diante do exposto acima, é razoável especular que esses “genes de regeneração” podem ser “genes mestres” ou mesmo estar relacionados com a presença de receptores para hormônios vegetais e/ou

podem codificar alguma enzima chave no metabolismo hormonal. Os possíveis locais onde os genes relacionados com a regeneração *in vitro* poderiam atuar são apresentados na Figura 4, adaptando-se o esquema proposto originalmente por Christianson & Warnick (1988). No futuro, o conhecimento aprofundado sobre a sensibilidade, o metabolismo hormonal e seu efeito na indução e/ou repressão de genes mestres que controlam a formação de gemas caulinares e raízes facilitará o entendimento da organogênese *in vitro* e suas aplicações biotecnológicas.

Referências

CARY, A.; UTTAMCHANDANI, S. J.; SMETS, R.; VAN ONCKELEN, H. A. & HOWELL, S. H. H. Arabidopsis mutants with increased organ regeneration in tissue culture are more competent to respond to hormonal signals. *Planta*, 213:700-707, 2001.

CHRISTIANSON, M.L. & WARNICK, D.A. Organogenesis in vitro as a developmental process. *HortScience*, 23:515-519, 1988.

FARIA, R. T. & ILLG, R. D. Inheritance of in vitro plant regeneration ability in the tomato. *Rev. brasil. Genética*, 19:113-116, 1996.

INOUE, T.; HIGUCHI, M.; HASHIMOTO, Y.; SEKI, M.; KOBAYASHI, M.; KATO, T.; TABATA, S.; SHINOZAKI, K. & KAKIMOTO, T. Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature*, 409:1060-1063, 2000.

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. & BUSO, J. A. (Eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, CBAB/EMBRAPA, 1999. p. 519-531.

KOORNNEEF, M.; BADE, J.; HANHART, C.; HORSMAN, K.; SCHEL, J.; SOPPE, W.; VEKERK, R. & ZABEL, P. Characterization and mapping of a gene controlling shoot regeneration in tomato. *Plant J.*, 3: 131-141, 1993.

LERCARI B.; MOSCATELLI, H. A.; GHIRARDI, E.; NICEFORO, R. &

BERTRAM, L.. Photomorphogenic control of shoot regeneration from etiolated and light-grown hypocotyls of tomato. *Plant Sci.*, 140:53-64, 1999.

PERES, L. E. P.; MORGANTE, P. G.; VECHI, C.; KRAUS, J. E. & VAN SLUYS, M-A. Shoot regeneration capacity from roots and transgenic hairy roots of different tomato cultivars and wild related species. *Plant Cell, Tissue and Org. Cult.*, 65:37-44, 2001.

PERES, L. E. P. ; AMAR, S.; KERBAUY, G. B; SALATINO, A.; ZAFFARI, G. R. & MERCIER, H. Effects of auxin, cytokinin and ethylene treatments on the endogenous ethylene and auxin-to-cytokinin ratio related to direct root tip conversion of *Catasetum fimbriatum* Lindl. (Orchidaceae) into buds. *J. Plant Physiol.*, 155:551-555, 1999.

PERES, L. E. P. & KERBAUY, G. B. High cytokinin accumulation following root tip excision changes the endogenous auxin-to-cytokinin ratio during root-to-shoot conversion in *Catasetum fimbriatum* Lindl. (Orchidaceae). *Plant Cell Rep.*, 18:1002-1006, 1999.

SKOOG, F. & MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11:118-231, 1957.

SMITH, L. G.; JACKSON, D. & HAKE, S. Expression of knotted1 marks shoot meristem formation during maize embryogenesis. *Developmental Genetics*, 16: 344-348, 1995.

TRAN THANH VAN, M. Direct flower neoformation from superficial tissue of small explants of *Nicotiana tabacum* L. *Planta*, 115: 87-92, 1973.

WHITE, P. R. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. ***Plant Physiol.*** 9: 585-600, 1934.

WILLIAMS, E. G. & MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis factors influencing coordinated behaviour of cell as an embryogenic group. *Ann. Bot.*, 57: 443-462, 1986.

WILMUT, I.; SCHNIEKE, A. E.; McWHIR, J.; KIND, A. J. & CAMPBELL, K. H. S. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. ***Nature***, 385: 810- 813, 1997. †