

A clonagem de plantas

CITAÇÃO

Canhoto, J.M. (2016)
A clonagem de plantas,
Rev. Ciência Elem., V4(01):002.
doi.org/10.24927/rce2016.002

EDITOR

José Ferreira Gomes,
Universidade do Porto

COPYRIGHT

© Casa das Ciências 2018.
Este artigo é de acesso livre,
distribuído sob licença Creative
Commons com a designação
[CC-BY-NC-SA 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/), que permite
a utilização e a partilha para fins
não comerciais, desde que citado
o autor e a fonte original do artigo.

rce.casadasciencias.org



Jorge M. Canhoto

CEF/ Universidade de Coimbra
jorgecan@uc.pt

"Love is only a dirty trick played on us to achieve continuation of the species."

W. Somerset Maugham

Em comparação com os animais, as plantas apresentam um desenvolvimento muito diferente. Esta situação resulta do facto de, nas plantas, a maior parte do desenvolvimento ser pós-embriónico, ou seja ocorrer depois do embrião ter germinado. Nos animais, pelo contrário, os órgãos formam-se durante o desenvolvimento embrionário. Outro aspeto interessante que distingue as plantas dos animais, em termos de desenvolvimento, é que a perda de um órgão num animal é normalmente irreversível, se exceções alguns animais que apresentam alguma capacidade regenerativa. Pelo contrário, nas plantas, o corte de um ramo, ou a remoção de folhas, não causa danos muito graves e as plantas podem recuperar dessa situação produzindo novos órgãos. Esta capacidade das plantas deve-se à existência de meristemas, locais onde as células, para além de apresentarem uma forte capacidade de proliferação têm também o potencial de formar novos tipos celulares, um processo conhecido como diferenciação. Isto significa que as plantas têm uma capacidade organogénica permanente que vai desde a germinação da semente até à morte da planta.

O Nas plantas são comuns dois tipos de reprodução. Um deles, a reprodução sexuada, envolve a formação de gâmetas e respetiva fusão numa célula chamada zigoto, seguida da formação de um embrião e, finalmente, a germinação e o desenvolvimento de uma nova planta. As plantas assim obtidas são geneticamente diferentes dos progenitores, uma consequência do processo de divisão subjacente à formação dos gâmetas, ou seja a meiose. Este tipo de reprodução é uma fonte de variabilidade genética, um aspeto importante não apenas para o potencial de adaptação das espécies a novas condições ambientais, mas também essencial para a obtenção de plantas com novas características de interesse para a agricultura. De facto, as novas variedades que todos os anos chegam ao mercado resultam, em grande parte, de cruzamentos e seleção das características mais interessantes.

No entanto, as plantas apresentam muitos órgãos adaptados à reprodução assexuada, ou seja a formação de novas plantas sem intervenção de gâmetas e sem que ocorra fecundação. Por exemplo, uma batata é simultaneamente um órgão de reserva e de reprodução

assexuada. Na batata existem meristemas que, em condições apropriadas dão origem a novos caules, que numa fase ulterior enraízam formando assim novas plantas. Outros órgãos de multiplicação vegetativa são, por exemplo, os estolhos dos morangueiros, ou os bulbos das tulipas. Nestes casos, as plantas obtidas a partir de um destes órgãos são geneticamente iguais entre si e também iguais à planta original. Um conjunto de plantas geneticamente iguais e descendente de um progenitor comum é chamado clone. Desta forma, o termo clone deve ser aplicado a um conjunto de indivíduos e não a uma única planta. O processo de obtenção de clones é chamado clonagem e, nas plantas, como já foi referido, é muito comum. Ao contrário da reprodução sexuada, em que o mecanismo de divisão celular subjacente é a meiose, na reprodução assexuada, muitas vezes designada nas plantas por multiplicação vegetativa, o mecanismo de divisão celular que serve de base à clonagem é a mitose.

Do ponto de vista natural, a clonagem é também importante para as espécies que utilizam este método de propagação, pois podem ocupar rapidamente um determinado habitat, por se tratar de um método de reprodução muito eficaz. Do ponto de vista da agricultura, a clonagem é também importante. Isso acontece, por exemplo, quando se pretende multiplicar um híbrido que não seja fértil. Um exemplo são algumas variedades de bananeira que são triploides e que não conseguem produzir gâmetas viáveis o que impede a reprodução sexuada. Assim, a multiplicação destas plantas tem que ser feita necessariamente por métodos de reprodução assexuada. Outra situação em que a clonagem é importante é no caso da multiplicação de espécies que são dioicas, ou seja em que existem plantas masculinas (produtoras de pólen) e plantas femininas. Para os agricultores, as plantas mais interessantes são as femininas, pois são elas que vão formar os frutos. No entanto, num cruzamento entre uma planta masculina e uma planta feminina a probabilidade de obter plantas masculinas ou femininas é de 50% para qualquer dos casos. Assim, os agricultores recorrem à clonagem para multiplicar as plantas femininas. Desta forma irão obter sempre plantas femininas geneticamente iguais à original.

Desde há milhares de anos que se recorre à clonagem de plantas para multiplicar génotipos de interesse. O processo mais simples de clonagem artificial é vulgarmente conhecido por estacaria. Neste método, uma estaca, que não é mais do que uma secção do caule com alguns centímetros de comprimento, é removida da planta que se pretende multiplicar e colocada a enraizar em solo ou num substrato artificial. Se utilizarmos 20 estacas de uma mesma planta iremos obter 20 plantas geneticamente iguais, ou seja um clone. Este método baseia-se em dois mecanismos de desenvolvimento diferentes. Por um lado, ao longo da estaca, na zona de inserção das folhas no caule (zona axilar) existem meristemas, denominados meristemas axilares. Estes meristemas, em condições naturais, estão muitas vezes dormentes devido à inibição causada pelo meristema apical (aquele que se encontra na extremidade de um ramo). Ao seccionarmos um ramo em estacas, estamos a remover o efeito inibidor do meristema apical o que favorece o desenvolvimento dos meristemas axilares, que assim formam novos ramos. Normalmente, apenas um novo ramo se forma, visto que o meristema que passa a ser o apical começa a exercer um efeito inibidor nos restantes meristemas axilares. O resultado deste processo é a formação de um novo caule. No entanto, para termos uma planta completa é necessário que o caule enraíze. Há espécies em que o enraizamento de estacas é fácil, como acontece com o choupo, por exemplo. Nestas espécies, ao fim de algum tempo no substrato, formam-se várias raízes,

chamadas adventícias. No entanto, em espécies como a oliveira ou o eucalipto, o enraizamento é mais difícil e requer a utilização de uma hormona (auxina). Existem atualmente à venda os chamados pós ou géis de enraizamento que incluem uma auxina e que servem para a indução de raízes adventícias em espécies em que a rizogénese é mais complicada.

Outro tipo de técnica de clonagem muito comum é a chamada enxertia. Neste tipo de método de reprodução assexuada o processo é mais complexo e requer técnicos com conhecimentos específicos. Em termos gerais, este método consiste em multiplicar uma planta de interesse (enxerto) numa outra planta que fornece o sistema radicular (porta-enxerto ou cavalo). Trata-se de um tipo de multiplicação vegetativa muito utilizada na videira ou em espécies como as macieiras e os pessegueiros. O caso da videira pode servir de exemplo para ilustrar o interesse desta técnica. Na segunda metade do século XIX uma praga da videira, conhecida como filoxera, chegou à Europa onde causou danos consideráveis com enormes prejuízos nesta fileira. Embora o inseto cause danos em toda a planta, os efeitos são particularmente graves ao nível do sistema radicular devido ao subsequente ataque de fungos. Existem, no entanto, videiras que são menos suscetíveis à filoxera. Entre estas encontra-se a videira americana, resistente ao inseto. Com base nesta resistência, aquilo que se fez para salvar as vinhas europeias foi enxertá-las em porta-enxertos de videira americana resistentes à filoxera. Desta forma, o sistema radicular da planta não é afetado e a parte caulinar continua a produzir uva da espécie de interesse. Deve salientar-se que uma enxertia não origina uma planta híbrida, mas sim uma planta que possui um sistema radicular de uma planta e a parte aérea de outra, sendo esta última aquela que interessa multiplicar. Existem atualmente porta-enxertos específicos para diferentes espécies, pois nem todas as associações entre enxerto e porta-enxerto podem dar os resultados pretendidos.

Desde meados do século XX começaram-se a utilizar outras técnicas de clonagem para além da enxertia e da estacaria. Essas técnicas são realizadas em laboratório, a partir de material vegetal de dimensões mais reduzidas que o utilizado nas técnicas convencionais. Em virtude conhecidas como micropropagação. Além disso, realizam-se em condições assépticas, em recipientes de vidro ou de plástico (FIGURA 1), contendo meios de cultura apropriados. Trata-se pois de processos de clonagem *in vitro*, daí que vulgarmente também sejam conhecidos como métodos de clonagem *in vitro*.



FIGURA 1. Medronheiro (*Arbutus unedo*) em fase de multiplicação *in vitro*.

Existem três métodos de clonagem in vitro: 1) proliferação de meristemas, 2) organogênese e embriogênese somática. Todos eles permitem a obtenção de um grande número de plantas (clonagem em larga escala), mas a metodologia para obter as plantas é diferente.

O método mais simples é a proliferação de meristemas. É muito parecido com a estacaria, mas realizado a uma escala laboratorial. Como material de partida (chamado explante) utiliza-se uma parte da planta onde exista um ou mais meristemas. Pode ser, por exemplo, o ápice de um ramo ou um nó do caule onde exista um ou mais meristemas axilares. O explante é colocado num meio gelificado rico em nutrientes minerais e contendo hormonas vegetais, vulgarmente auxinas. Ao fim de algum tempo, o meristema inicia o seu desenvolvimento e dá origem a um novo caule (FIGURA 2). Imaginemos que, após um mês de cultura, o explante original dá origem a um caule com 5 nós, ou seja 5 zonas de inserção de folhas. Em cada um desses nós vai existir um meristema axilar que tem a capacidade de iniciar um novo caule. Se cortarmos agora estes 5 nós e os cultivarmos em meio fresco cada um deles vai produzir, ao fim de mais um mês de cultura, 5 novos nós. Ou seja ao fim de um mês teremos 5 nós, ao fim de dois 25 e assim sucessivamente. Ao fim de um ano de ensaios o número potencial de novas plantas seria de 5^{12} . Facilmente se imagina que após um ano de cultura o número potencial de plantas que se pode obter é astronómico; neste caso cerca de 250 milhões. Na prática este número é bastante mais reduzido, pois ocorrem perdas durante o processo e lidar com um número tão grande de plantas coloca problemas logísticos difíceis de ultrapassar. No entanto, estes valores dão uma ideia clara do potencial de clonagem deste método. À semelhança do que foi referido para a estacaria, cada um destes caules tem que ser enraizado para originar uma planta completa. Este é o método mais simples de clonagem in vitro, pois inicia-se a partir de meristemas que já existem no explante original. Muitas empresas que se dedicam à clonagem de plantas utilizam este método para multiplicar as mais variadas espécies, desde árvores como o eucalipto ou a oliveira até espécies de interesse ornamental ou agronómico.



FIGURA 2. Recipiente contendo vários rebentos caulinares de tamarilho (*Solanum betaceum*) obtidos por proliferação de meristemas axilares.

A organogênese é uma técnica diferente da anterior no sentido em que se utilizam explantes que não possuem meristemas. O objectivo neste caso é induzir a formação de no-

vos meristemas caulinares, chamados meristemas adventícios. Para a indução de novos meristemas o explante, por exemplo, um segmento foliar, é cultivado num meio de cultura semelhante ao utilizado na técnica anterior, mas em que se utiliza uma combinação de dois tipos de hormonas: auxinas e citocininas. Após algum tempo em condições de humidade, temperatura e luminosidade controladas, normalmente 3 a 5 semanas, algumas células do explante dão origem a massas de células, chamadas calos, nos quais, ulteriormente se diferenciam os meristemas. Em casos menos comuns, as próprias células do explante podem formar meristemas sem passagem por uma fase de calo. Estes meristemas originam um segmento caulinar que será depois enraizado para obtenção de uma nova planta. Cada explante pode formar dezenas ou mesmo centenas de meristemas obtendo-se assim, a partir de um único explante, centenas de plantas.

Finalmente, uma terceira técnica de clonagem *in vitro* é a embriogénese somática. Este método induz a formação de embriões (FIGURA 3) a partir de células do corpo (soma) da planta, daí a designação da técnica e dos embriões obtidos – embriões somáticos. Os embriões somáticos são muito parecidos com os embriões zigóticos correspondentes. No entanto, enquanto os embriões zigóticos produzidos por uma planta são geneticamente diferentes entre si e distintos da planta mãe, os embriões somáticos vão ser geneticamente iguais à planta dadora do explante. No caso da embriogénese somática, os explantes são cultivados em meios contendo uma auxina. Ao fim de algum tempo, algumas células do explante comportam-se como um zigoto e dão origem a embriões. Num mesmo explante, podem ser formados centenas de embriões somáticos. A vantagem da embriogénese em relação aos outros métodos é que não é necessário induzir raízes adventícias, uma vez que o embrião e uma estrutura bipolar com um pólo caulinar e um pólo radicular que, após germinação vão dar origem, respectivamente, ao caule e raiz da planta. Para além de ser um excelente método de clonagem, a embriogénese somática permite ainda o estudo da embriogénese de uma maneira mais eficaz, pois a embriogénese zigótica decorre no interior do óvulo, o que dificulta o acesso ao embrião. A indução de embriogénese somática baseia-se numa propriedade que algumas células vegetais apresentam e que é chamada totipotência.

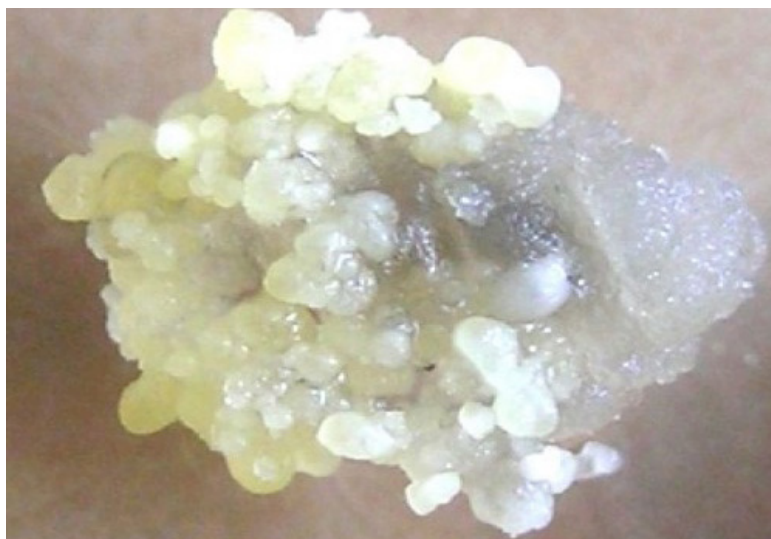


FIGURA 3. Embriões somáticos de tamarilho (*Solanum betaceum*) em fases precoces de desenvolvimento.

As técnicas de clonagem são actualmente importantes ferramentas ao serviço do melhoramento e do estudo dos mecanismos de desenvolvimento das plantas dada a facilidade com que é possível induzir a formação de órgãos ou de embriões nestes sistemas experimentais.

REFERÊNCIAS

- ¹ CANHOTO, J.M., *Biotecnologia Vegetal – da Clonagem de Plantas à Transformação Genética*. Imprensa da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2010.
- ² CHAWLA, H.S., *Introduction to Plant Biotechnology*. Science Publishers, Enfield, 2009.
- ³ KYTE, L., *et al.*, *Plants from Test Tubes – an Introduction to Micropropagation* (4ª ed). Timber Press, Portland, 2013.
- ⁴ SMITH, R.H., *Plant Cell Culture*. In: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2001. <http://www.els.net> doi: [10.1038/npg.els.0002581](https://doi.org/10.1038/npg.els.0002581)
- ⁵ SMITH, R.H., *Plant Tissue Culture – Techniques and Experiments* (3ª ed). Academic Press, Amsterdam, 2013.