

## Manual de Procedimentos do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental





ISSN 1517-3135

Dezembro, 2008

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Amazônia Ocidental  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

# **Documentos 61**

## **Manual de Procedimentos do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental**

*Regina Caetano Quisen  
Paula Cristina da Silva Angelo*

Embrapa Amazônia Ocidental  
Manaus, AM  
2008

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

### **Embrapa Amazônia Ocidental**

Rodovia AM-010, km 29, Estrada Manaus/Itacoatiara

Caixa Postal 319

Fone: (92) 3303-7800

Fax: (92) 3303-7820

www.cpa.embrapa.br

### **Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: *Celso Paulo de Azevedo*

Secretária: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

Membros: *Cheila de Lima Boijink*

*Cintia Rodrigues de Souza*

*José Ricardo Pupo Gonçalves*

*Luis Antonio Kioshi Inoue*

*Marcos Vinícius Bastos Garcia*

*Maria Augusta Abtibol Brito*

*Paula Cristina da Silva Ângelo*

*Paulo César Teixeira*

*Regina Caetano Quisen*

*Síglia Regina dos Santos Souza*

Revisor de texto: *Síglia Regina dos Santos Souza*

Normalização bibliográfica: *Maria Augusta Abtibol Brito*

Diagramação: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

Capa: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

Fotos da capa: *Regina Caetano Quisen*

**1ª edição**

1ª impressão (2008): 300

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,  
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.  
Embrapa Amazônia Ocidental.**

---

Quisen, Regina Caetano.

Manual de procedimentos do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa  
Amazônia Ocidental / Regina Caetano Quisen, Paula Cristina da Silva Ângelo.  
Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2008.

44 p. - (Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos; 61).

ISBN 1517-3135

1. Cultura de tecidos. 2. Manual. I. Quisen, Regina Caetano. II. Ângela, Paula  
Cristina da Silva. III. Título. IV. Série.

CDD 581.0724

# **Autores**

## **Regina Caetano Quisen**

Engenheira florestal, D.Sc. em Biotecnologia Vegetal, pesquisadora da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM,  
regina.quisen@cpaa.embrapa.br

## **Paula Cristina da Silva Angelo**

Bióloga, D.Sc. em Ciências Biológicas/Genética, pesquisadora da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM, paula.angelo@cpaa.embrapa.br



# Apresentação

No decorrer do “aprofundamento” da genética de plantas como ciência, novas metodologias foram sendo utilizadas na seleção eficiente de genótipos, visando à introdução de novas características, como aumento de produtividade de importantes culturas agrícolas, resistência a doenças e pragas e a condições ambientais adversas, que resultaram em melhor qualidade tecnológica e nutricional do produto final.

Esses ganhos foram obtidos por meio do melhoramento genético de plantas e de suas ferramentas mais modernas, tais como a biotecnologia vegetal, que tem exercido grande reflexo sobre agricultores, indústria alimentar, consumidores e, sobretudo, no meio ambiente.

O domínio de muitas técnicas, como a da cultura de tecidos de plantas, assume importância crucial no avanço desse conhecimento. A cultura de tecidos constitui excelente ferramenta para clonagem de plantas em escala comercial, além de colaborar na realização de estudos de transformação genética e na conservação de espécies vegetais e permitir a interação entre fatores abióticos e bióticos, resultando em plantas saudáveis, vigorosas e geneticamente superiores, que podem ser multiplicadas massivamente.

Considerando a importância dessa técnica, a compreensão e o domínio de conceitos básicos para a aplicação da cultura *in vitro*, esperamos, com a publicação deste documento, mostrar à sociedade, de forma simples e prática, as rotinas determinantes para o bom desempenho e funcionamento de um laboratório de cultura de tecidos de plantas.

*Maria do Rosário Lobato Rodrigues*  
Chefe-Geral





# Sumário

<b>Manual de Procedimentos do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental.....</b>	<b>9</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>9</b>
<b>Abreviaturas e definições úteis.....</b>	<b>10</b>
<b>Cultura de tecidos vegetais – conceito e aplicações.....</b>	<b>13</b>
<b>Padrões morfogênicos in vitro.....</b>	<b>14</b>
<b>O ambiente e a organização do laboratório.....</b>	<b>16</b>
<b>Equipamentos e procedimentos de segurança.....</b>	<b>18</b>
Autoclave.....	19
Equipamentos de tratamento da água.....	19
<b>Segurança em laboratório.....</b>	<b>23</b>
<b>O meio de cultura.....</b>	<b>25</b>
<b>Preparo do meio de cultura.....</b>	<b>31</b>

<b>Lembretes gerais.....</b>	<b>36</b>
<b>Cálculos.....</b>	<b>37</b>
<b>Referências.....</b>	<b>39</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>42</b>
<b>Tabela 4. Características e armazenamento de sais minerais e vitaminas utilizados nos meios de cultura.....</b>	<b>42</b>
<b>Tabela 5. Determinação do volume a ser aliquotado (em mL) a partir de solução-estoque de regulador de crescimento de 1 mg/1 mL.....</b>	<b>43</b>
<b>Tabela 6. Valores de concentrações e equivalências matemáticas.....</b>	<b>44</b>
<b>Tabela 7. Grau de perda de compostos freqüentemente utilizados para a cultura de tecidos vegetais por meio de aquecimento do meio de cultura.....</b>	<b>44</b>

# Manual de Procedimentos do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Occidental

---

*Regina Caetano Quisen*

*Paula Cristina da Silva Angelo*

## Introdução

A possibilidade de manipulação de células, tecidos e órgãos in vitro está fundamentada na capacidade de as células vegetais, mesmo separadas da planta-mãe, continuarem a crescer quando cultivadas em condições apropriadas. A técnica da cultura de tecidos vegetais parte da premissa de que todas as células da planta apresentam capacidade de gerar um indivíduo, conhecida como hipótese da totipotencialidade das plantas, formulada por Schleiden & Schivann em 1838 (VASIL et al., 1979).

Com a evolução da técnica na segunda metade do século passado, muitos avanços relacionados ao cultivo celular têm sido obtidos, desde a descoberta dos reguladores de crescimento, dos trabalhos pioneiros em melhoramento até a aplicação na engenharia genética e na transformação genética de plantas. Nos últimos anos, esses estudos têm maior enfoque na organogênese, embriogênese, conservação e intercâmbio de germoplasma, diferenciação, mutagênese, hibridação, produção de metabólitos secundários, fusão de protoplastos, entre outros, demonstrando o potencial da técnica de cultivo in vitro para inúmeras espécies e áreas de pesquisa, generalizando sua aplicação.

Nesse contexto, o presente manual foi elaborado com o intuito de apresentar, de forma sucinta, aspectos teóricos da cultura in vitro e orientar usuários de laboratórios de cultura de tecidos vegetais, com relação à padronização de normas, procedimentos e orientações metodológicas.

## Abreviaturas e definições úteis

ABA	ácido abscísico
BAP	benzilaminopurina
2,4-D	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
DMSO	dimetilsulfóxido
EDTA	etilenodiaminotetracetato
GA3	ácido giberélico
AIA	ácido indol-3-acético
AIB	ácido indolbutírico
2iP	6- (g,g-dimetilaliminol) purina
MS	Murashige e Skoog
ANA	ácido naftalenoacético
PEG	polietilenoglicol
PVP	polivinilpirrolidona
V/V	Volume/Volume

A técnica da cultura de tecidos vegetais envolve o uso de uma série de termos, os quais precisam ser bem definidos para melhor entendimento do trabalho que está sendo realizado, dentre os quais destacam-se:

- **Aclimação ou aclimatização:** processo de adaptação da planta às condições ambientais, após sua remoção da condição *in vitro*, antes do transplante para local definitivo.
- **Alongamento:** crescimento do eixo da planta ou da célula, principalmente na direção longitudinal.
- **Ápice meristemático:** estrutura constituída do meristema apical e de um ou dois primórdios foliares.
- **Assepsia:** na cultura *in vitro*, significa ausência de qualquer microrganismo.
- **Autotróficas:** células, plantas ou outros organismos capazes de sintetizar carboidratos a partir de componentes inorgânicos.
- **Biofábrica:** método de propagação massal que utiliza a micropropagação para reproduzir plantas de interesse econômico de forma mais rápida e homogênea, conservando ou aprimorando as características genéticas iniciais e desejadas da planta que lhe deu origem.

- **Calo:** proliferação desorganizada de células a partir de segmentos de órgãos das plantas, irregularmente diferenciadas, normalmente em resposta a injúrias químicas ou físicas.
- **Célula diferenciada:** qualquer célula não meristemática.
- **Célula não diferenciada:** célula meristemática ou que foi artificialmente induzida à perda da identidade tissular.
- **Clone:** grupo de células geneticamente idênticas produzidas assexuadamente (por divisões mitóticas) de uma célula isolada, ou de plantas oriundas de um único indivíduo por propagação vegetativa.
- **Competência:** é a capacidade de uma célula particular ou grupo de células responder de maneira esperada, quando fornecido o sinal de desenvolvimento apropriado.
- **Cultura de anteras:** cultivo in vitro de anteras isoladas do botão floral, com o objetivo de obter plantas haplóides.
- **Desdiferenciação celular:** retorno de células diferenciadas ao estado meristemático não diferenciado.
- **Determinação celular:** processo pelo qual o potencial de desenvolvimento de uma célula torna-se limitado a uma rota específica.
- **Diferenciação:** processo de diversificação das características bioquímicas, anatômicas, morfológicas e fisiológicas, ocorrido nas células, que as distingue daquelas que lhes deram origem.
- **Dominância apical:** inibição hormonal das gemas laterais (axilares) pelas gemas apicais.
- **Embrião somático:** embrião formado a partir de células somáticas seguindo os mesmos padrões de desenvolvimento do embrião zigótico.
- **Embriogênese somática:** formação de embriões somáticos, que darão origem a plantas inteiras.
- **Explante:** material utilizado para o início da cultura in vitro. Pode ser um ápice meristemático, um segmento de folha ou raiz, ou qualquer órgão da planta que melhor se adaptar para o início da cultura. O tipo do explante varia de uma cultura para outra.
- **Fluxo laminar:** padrão de fluxo de ar que se movimenta no sentido unidirecional, com velocidade constante.

- **Habituação:** habilidade adquirida por uma população de células de crescer e se dividir independentemente do suprimento exógeno de substâncias reguladoras de crescimento.
- **Híbrido somático:** produto da fusão de duas células somáticas, geneticamente diferentes. A fusão é feita utilizando-se protoplastos.
- **Indução:** é o desencadeamento de um processo morfogênético pela exposição do explante a estímulos físicos, químicos ou biológicos.
- **In vitro:** termo aplicado para designar crescimento de células, tecidos ou órgãos vegetais em meio de cultura, em condições assépticas.
- **Meio (nutritivo):** combinação de sais minerais (macro e micronutrientes), carboidrato(s), vitaminas e reguladores de crescimento.
- **Meristema:** tecido composto de células não diferenciadas, envolvido com síntese protoplásmica e formação de novas células por divisão mitótica.
- **Micropropagação:** propagação de plantas in vitro a partir de ápices meristemáticos ou segmento nodal, com objetivo de produção de mudas em grande escala.
- **Morfogênese:** surgimento de qualquer órgão (parte aérea, flor, raiz) a partir de células ou tecidos que originalmente não possuem essa forma ou estrutura.
- **Organogênese:** formação de brotos e/ou raízes in vitro. A organogênese pode ser direta, quando a regeneração ocorre a partir de órgãos ou segmentos de material vegetal, sem passar pela fase de calo, ou indireta, quando a regeneração ocorre a partir de calos.
- **Protoplastos:** são células desprovidas de parede celular.
- **Regeneração:** em cultura de tecidos de plantas, significa uma resposta morfogênética de um explante a um estímulo que resulta na formação de partes aéreas, embriões ou planta.
- **Repicagem:** transferência do calo ou material vegetativo em cultivo para um novo meio nutritivo.
- **Subcultura:** cultura de subdivisões de tecido, já estabelecido in vitro, em novo meio.
- **Suspensão celular:** cultura de células ou agregados celulares em meio líquido, sob agitação.

- **Tecido diferenciado:** qualquer tecido não meristemático.
- **Tecido não diferenciado:** tecido meristemático, organizado, mas não diferenciado.
- **Tecido não organizado:** calo somente.
- **Tecido organizado:** qualquer outro tecido, exceto calo.
- **Totipotência:** capacidade de células individuais expressarem o fenótipo da planta completa da qual foram derivadas.
- **Varição somaclonal:** modificações genéticas ou epigenéticas que ocorrem nos tecidos cultivados in vitro. Essas variações acontecem com maior frequência quando ocorre passagem pela fase de calo ou quando há manutenção por tempo muito longo in vitro e, algumas vezes, quando ocorrem repicagens muito freqüentes.
- **Vitrificação ou hiperidricidade:** manifestação fisiológica provavelmente devida ao excesso de absorção de água em cultura de tecidos, em função de diversos fatores, tomando os brotos vitrificados e quebradiços.

## Cultura de tecidos vegetais – conceito e aplicações

Entende-se por cultura de tecidos vegetais o conjunto de técnicas de cultivo in vitro de células e tecidos vegetais (explantes) em meio nutritivo sintético, de composição definida, sob condições adequadas de assepsia, nutrição e fatores ambientais como luz, temperatura, O<sub>2</sub> e Co<sub>2</sub>, para gerar uma planta.

A cultura in vitro de plantas é uma técnica que apresenta importância prática para as áreas agrícola e florestal e também para a área científica básica, como a biologia de plantas, onde aparece como uma das técnicas mais polivalentes. Um dos principais objetivos da cultura de tecidos é prover uma alternativa de manipular plantas em nível molecular.

As principais aplicações das técnicas de cultura de tecidos vegetais podem ser sumarizadas como segue:

- **Micropropagação:** é a multiplicação rápida de indivíduos vegetais. Essa rapidez deve-se, entre outros fatores, à possibilidade de obter elevado número de explantes a partir de uma planta matriz, e a velocidade da multiplicação é devida ao controle, tanto do meio como das condições ambientais nas quais se conduz a multiplicação.

- Obtenção de plantas livres de viroses por meio de técnicas variadas, tais como: cultura de meristemas, microenxertia e termoterapia, as quais devem ser testadas por indexação.
- Melhoria genética vegetal: por meio da cultura *in vitro* é possível: a) obtenção de indivíduos haplóides e duplicação posterior do genoma para dar origem a linhagens haplo-diploidizadas, diplóides, homocigóticos; b) indução de mutantes visando a determinadas características para melhoria; c) intercâmbio e conservação de germoplasma; d) regeneração de células ou de tecidos transgênicos; e) polinização *in vitro* visando a romper a incompatibilidade pré-zigótica, assim como pós-zigótica pelo resgate de embriões; f) transposição de barreiras de incompatibilidade, por meio da fusão de protoplastos e engenharia genética, e seleção por resistência a determinado agente.
- Produção de metabólitos secundários: a cultura de tecidos permite estudar a produção de metabólitos e maximizar a produção e a extração dessas substâncias.
- No campo da aplicação básica, a cultura de tecidos dá suporte técnico também à bioquímica, à fisiologia vegetal, à fitopatologia e à citogenética. Na bioquímica, para estudo e elucidação de rotas metabólicas. Na fisiologia, para estudos de crescimento e desenvolvimento, efeito de metais pesados, etc. Na fitopatologia, para estudos de toxinas. Na citogenética, para estudos de cromossomos ou aberrações cromossômicas (quebras cromossômicas).

## **Padrões morfogênicos *in vitro***

As variações na forma e nas funções das células, resultantes de mudanças quantitativas e alterações qualitativas dos componentes celulares, conduzem a um processo morfogênico que depende, sobretudo, da intensidade de determinação e da competência das células (GEORGE, 1996).

Dessa forma, tecidos, órgãos ou células com intensidades de determinação variadas podem adquirir novas competências por meio da ação de certos sinais químicos que ativam seletivamente determinados genes.



O controle da morfogênese, segundo Thorpe (1980), é exercido por fatores internos inerentes ao explante, como genótipo, condições fisiológicas e correlações entre células e tecidos, e também por fatores externos, como meio de cultura, reguladores de crescimento e condições ambientais.

A resposta final, nos mais variados tecidos, é a expressão morfogenética a partir de diferentes rotas: organogênese e embriogênese somática.

- **Organogênese:** é caracterizada pela produção de uma estrutura unipolar em conexão vascular com o tecido vascular pré-existente e ocorre com o subsequente desenvolvimento de um primórdio de gema vegetativa ou raiz (BROWN; THORPE, 1986). Essa expressão pode acontecer de forma direta ou indireta. No primeiro caso, a partir do explante primário, dá-se a formação de um órgão ou meristemóide. A forma indireta, por sua vez, ocorre a partir da desdiferenciação do explante, resultando na formação de calos, que podem ser definidos como a proliferação de massas de células não diferenciadas, conduzindo à formação de meristemas morfogenéticos que originam raízes ou brotos. Existem basicamente três técnicas de manipulação da organogênese em sistemas *in vitro*: a) cultura de meristemas apicais; b) proliferação de gemas axilares; e c) indução e proliferação de gemas adventícias.
- **Embriogênese somática:** é uma via de expressão morfogenética, na qual o novo indivíduo, o embrião somático, origina-se a partir de células simples, não resultantes da fusão de gametas, apresentando broto e raiz conectados por um sistema vascular fechado. A embriogênese também pode ocorrer de forma direta ou indireta. Há hipóteses de que a embriogênese direta ocorre *in vitro* somente a partir de células do explante que são predispostas (predeterminadas) a se transformar em embriões, produzidas antes de sua transferência para a cultura, onde o meio e outras condições servem apenas para incentivar o processo. A embriogênese somática indireta requer que as células diferenciadas de um explante sejam induzidas a produzir calos não diferenciados e, então, que algumas células se tornem comprometidas ou predeterminadas a entrar em uma rota embriogênica.

Os estágios de desenvolvimento, no processo de propagação in vitro, ocorrem em uma seqüência de passos, assim resumidos:

- Estabelecimento da cultura asséptica.
- Desenvolvimento do explante, seguindo a rota escolhida para os experimentos, o qual sofre interferências da interação entre genótipo, ambiente e explante.
- Transferência das plantas para o ambiente externo.

Cada um desses estágios apresenta diferentes objetivos e exigências, em relação à composição do meio de cultura, concentração e tipo de regulador de crescimento, e a condições ambientais como luz, temperatura e fotoperíodo.

## **O ambiente e a organização do laboratório**

O ambiente ideal para instalação do laboratório de cultura de tecidos deve assegurar o máximo de isolamento do ambiente externo, a fim de evitar contaminantes que possam inviabilizar as culturas in vitro. Surge, portanto, a necessidade de uma instalação com características apropriadas e com equipamentos e normas de trabalho que possibilitem a criação de um ambiente com elevado nível de limpeza e assepsia.

Reforçando a idéia de que o laboratório deve prezar pela limpeza e limitar a circulação de pessoas, visando ao controle de contaminação no ambiente, algumas recomendações são necessárias:

- As paredes e pisos devem facilitar a limpeza.
- Os acessos devem ser limitados, minimizando a entrada de sujeira, poeira e contaminantes.
- As janelas não são necessárias, pois dificultam o controle da luz e da temperatura, mas quando existirem devem ser duplas, para evitar a entrada de poeira, animais e contaminantes.
- As paredes devem ser brancas, para refletir a luz e a iluminação abundante.
- A temperatura ambiente deve ser agradável, preferencialmente com ar condicionado, com exceção da sala de cultura, que deve ter temperatura, umidade e luminosidade controladas.

De maneira geral, um laboratório de cultura de tecidos deve ter as seguintes dependências:

- **Ante-sala:** ambiente de recepção que protege o laboratório das ações do ambiente externo, o qual deve conter tapetes para limpeza dos calçados, armários para armazenamento de bolsas e sacolas dos usuários do laboratório, banheiros e copa-cozinha, quando necessário.
- **Área de lavagem e esterilização:** local destinado ao descarte de meios de cultura utilizados e outros resíduos, à lavagem de vidrarias, à autoclavagem de água, aos meios de cultura e a utensílios diversos. Nesse ambiente, são obrigatoriamente colocados os equipamentos: autoclave, destilador(es), deionizador(es), geladeira e lavador de pipeta. Essa sala deve estar localizada distante da sala de inoculação e, de preferência, deve dispor de um exaustor para a eliminação de vapores desprendidos pela autoclave. Também deve ser dotada de pias com cubas grandes, bancadas, prateleiras, armários para armazenamento temporário de vidrarias, estufas para secagem e esterilização de pinças e bisturis.
- **Área de meios de cultura:** local destinado ao preparo de meios de cultura e de soluções diversas. Esse ambiente deve ser de tamanho suficiente para circulação de pessoas e para conter bancada com gavetas e pia, armários, prateleiras, geladeiras e *freezers*. Os equipamentos necessários para as rotinas de preparo de meios são: pHmetro, agitador magnético, microondas, aparelho de vácuo e balanças de precisão e analítica. As balanças devem ficar preferencialmente em local isolado e protegido da circulação de ar.
- **Área para manipulação asséptica:** local onde exclusivamente são realizadas inoculações e transferências de material vegetal. Além da(s) câmara(s) de fluxo laminar, onde são manipuladas as culturas, o local deve conter estantes para estocagem temporária de meios de cultura já autoclavados, além de outros materiais estéreis. Deve ser localizada próxima à sala de incubação de culturas, mantida sempre fechada e de circulação restrita ao pessoal do laboratório.
- **Área para incubação das culturas:** local dotado de sistema de controle de temperatura, luz e umidade, no qual as culturas são mantidas até o momento de ser retiradas dos frascos. Deve conter estantes metálicas com lâmpadas fluorescentes branca-fria e/ou grow-luz fixadas na parte inferior da prateleira, distanciadas 40 cm – 50 cm entre si. Além das estantes, pode conter câmaras de BOD (Byosistem Organized

Development) e mesas de agitação orbital para culturas de células em suspensão. Esse ambiente deve ser mantido sempre fechado e com entrada restrita.

- **Área para observação e avaliação das culturas:** ambiente pequeno contendo bancada de trabalho para avaliações parciais ou finais de experimentos in vitro. Essas observações são realizadas com auxílio de microscópios estereoscópicos e lupas e registradas com câmaras fotográficas acopladas a esses equipamentos. Esse ambiente pode ser conjugado à área de balanças.
- **Almoxarifado:** é nesse compartimento que devem ser colocadas estantes ou prateleiras para guardar reagentes químicos e materiais diversos em estoque a ser utilizados na rotina laboratorial. Deve ser ambiente de acesso restrito, devendo-se respeitar as normas de segurança quanto ao armazenamento dos produtos químicos, tais como temperatura e luz.
- **Casa de vegetação, câmara de nebulização e telado:** ambientes anexos ao laboratório, destinados à aclimação de plantas produzidas in vitro. Dependendo da condição climática da região, esses abrigos podem variar desde um simples telado até ambientes mais modernos, equipados com sistema de nebulização com atomizadores, mais eficientes na manutenção permanente da umidade elevada em todo o ar na instalação.

O laboratório de pesquisa deve possuir no mínimo salas de preparação de meios de cultura, de inoculação, de crescimento e de observação e uma casa de vegetação ou telado. As biofábricas, por sua vez, deverão possuir salas de escritório, de preparo de meio de cultura, de inoculação e/ou crescimento, almoxarifado e casa de vegetação ou telado.

## **Equipamentos e procedimentos de segurança**

Para o adequado manuseio dos equipamentos, é imprescindível, antes do uso, a leitura do manual de instruções, pois, ao seguir as orientações do fabricante, garante-se a segurança do usuário e a boa conservação de cada equipamento.

A seguir, algumas características comuns dos principais equipamentos são descritas, assim como os cuidados específicos quando do manuseio desses equipamentos.

## Autoclave

Equipamento horizontal ou vertical utilizado para a esterilização de meios de cultura, vidrarias, água e outros materiais utilizados no ambiente asséptico da câmara de fluxo laminar. Através da produção de calor seco ou úmido, a autoclave vem regulada de fábrica para trabalhar a uma pressão de  $1,05 \text{ kg/cm}^2$  que resulta na temperatura de  $121^\circ\text{C}$ . O tamanho ideal da autoclave depende basicamente da rotina de trabalho de cada laboratório. Para laboratórios de pesquisa pequenos, modelos menores são mais indicados, enquanto em laboratórios com maior fluxo de trabalho, os equipamentos de maiores dimensões são mais indicados. A instalação da autoclave na sala de lavagem e esterilização deve prever a saída de água quente e de vapor.

Independentemente do modelo utilizado, sempre, antes de iniciar o funcionamento desses equipamentos, é obrigatória a verificação do nível d'água. Caso esteja baixo, completar com água destilada, até cobrir as resistências elétricas.

O tempo de autoclavagem deve ser respeitado de acordo com o material a ser esterilizado, nunca ultrapassando os limites estipulados. O uso da autoclave deve ser otimizado e planejado de acordo com sua capacidade, pois é um equipamento que consome muita energia. A abertura do equipamento deve ser feita logo após finalização do ciclo da autoclavagem e assim que a pressão chegue a zero, começando pela válvula. A tampa deve ser aberta somente quando todo o vapor estiver sido liberado, devendo-se tomar muito cuidado, pois o vapor é extremamente quente e, em contato com a pele, pode causar sérias queimaduras. O uso de luvas de amianto é recomendado.

## Equipamentos de tratamento da água

A água de laboratório não apenas tem uma elevada pureza em termos iônicos, como também é livre de compostos orgânicos e microrganismos. Uma água muito boa tem condutividade  $< 1,0 \mu\text{S/cm}$  (resistividade  $> 1,0 \text{ M}\Omega/\text{cm}$ ) e teor de carbono orgânico total inferior a 50 ppb. Água com essa qualidade pode ser usada para uma multiplicidade de aplicações que vão desde a preparação de reagentes e soluções até à preparação de meios nutrientes para cultura de células e estudos microbiológicos. A água com grau para laboratório pode ser produzida por destilação dupla ou por sistemas de purificação de água que incorporem tecnologias de purificação múltiplas a seguir:

- **Destilador** (aquecer, ferver, evaporar, condensar e coletar): o processo de destilação remove partículas iônicas, material volátil e microrganismos. A destilação baseia-se na mudança da fase líquida para a gasosa, e posteriormente para a condensada. As impurezas voláteis como gases (CO<sub>2</sub>) são difíceis de ser removidas. Recomenda-se que tenha reservatório de vidro especial, pois reservatório metálico libera o metal correspondente na água. No caso de esse equipamento estar conectado entre o deionizador e a fonte de água, esse tipo de contaminação deixa de ser problema. O processo de destilação tem alto consumo de energia (~ 1 kW/litro) e de água (~ 30 L/litro), baixa condutividade e resistividade (1 M/cm), não elimina CO<sub>2</sub> e amônia voláteis, e é um processo lento (~ 5 L/h).
- **Deionizador**: o processo contínuo remove impurezas dissolvidas ionizadas, através da passagem da água por resinas sintéticas de troca iônica, sem ocorrer remoção da matéria orgânica ou de microrganismos. Deve ser instalado de forma que permita conexão alternativa com o destilador ou com a fonte de água. Quando instalado após o destilador, o deionizador recebe a água com baixíssimo teor de sais, o que resulta em aumento da vida útil de suas colunas. A água deionizada tem geralmente resistividade de 18 MΩ/cm.
- **Osmose reversa**: a purificação é feita pela combinação de um cartucho de osmose reversa com um de adsorção por carvão ativado, um de troca iônica e uma filtração por microporo (0,22 m) produzindo água ultrapura, onde são removidos 100% de bactérias e matéria orgânica, 90% das partículas iônicas dissolvidas. Entretanto, esse processo não promove a remoção de gases. Os equipamentos utilizados são de maior custo; no entanto, a água produzida tem condutividade elétrica menor que 1 μS, baixo consumo de energia elétrica, não consome água de refrigeração, e apenas a água impura é expelida através do dreno.
- **Água ultrapura**: é a água que se aproxima de graus teóricos de pureza em termos de resistividade, teor orgânico, contagens de partículas e de bactérias. Esse nível de pureza é obtido “fazendo o polimento” da água que foi pré-purificada por permuta iônica, osmose inversa ou destilação. A água de grau ultrapuro é necessária para diversas técnicas analíticas sensíveis e também em aplicações como a cultura de tecidos e a fertilização in vitro (IVF).

- **Peagâmetro (pHmetro):** aparelho necessário para determinação e ajuste do pH de meios de cultura e deve ter precisão de 0,1 unidade. Existem vários modelos que apresentam diferentes formas de funcionamento, nos quais basicamente devem ser respeitados alguns procedimentos. Os equipamentos devem ser ligados alguns minutos antes de sua utilização. Para o ajuste do aparelho, devem ser utilizados os padrões de pH, seguindo as instruções do fabricante (manual), quanto à seqüência de procedimentos para ajuste. As soluções padrões, quando armazenadas em geladeira, devem ser somente utilizadas à temperatura ambiente. O meio de cultura deve ser mantido em agitação contínua para o ajuste do pH, e o ajuste para o valor desejado deve utilizar NaOH 0,1 mol/L a 1,0 mol/L ou HCl 0,1 mol/L a 1,0 mol/L.
- **Câmara de fluxo laminar:** equipamento que força a passagem de ar por meio de um filtro bacteriológico, de modo que seja criado um ambiente estéril com pressão positiva, que evita a entrada do ar externo contaminado. É essencial no laboratório, pois nele é realizada a manipulação asséptica das culturas in vitro. Deve ser mantida em local com bom nível de assepsia, para preservar a vida útil do filtro. Os fluxos devem ser limpos com álcool 70% – 90% ou lisofor 5% (com exceção do visor acrílico) antes do início das atividades e ao final de cada dia de trabalho. É importante que a câmara não seja colocada de frente para porta, ventilador ou aparelho de ar condicionado, os quais podem criar correntes de ar capazes de vencer a pressão positiva gerada na câmara, mesmo distando dela. O trânsito atrás do operador deve ser minimizado. O operador não deve atrapalhar o fluxo de ar gerado com movimentos repetidos de retirada e introdução das mãos dentro do fluxo. Ligar o fluxo 10 minutos antes do uso e mantê-lo funcionando por pelo menos mais 5 minutos após o término do procedimento, antes de desligá-lo. Limpar novamente o fluxo após o uso. As lâmpadas de luz ultravioleta devem ser ligadas pelo menos 20 minutos antes de iniciar o trabalho, visando a esterilizar o ambiente interno da câmara de fluxo. Nesse caso, ninguém deve permanecer no ambiente, e as portas de acesso à sala de incubação devem ser mantidas fechadas ou a passagem da luz ultravioleta deve ser bloqueada. É importante reforçar os cuidados necessários durante a utilização de lâmpadas UV, uma vez que elas podem causar queimaduras, são altamente mutagênicas e devem ser mantidas desligadas durante o trabalho na câmara. As datas de manutenção da câmara de fluxo laminar e troca de filtro devem ser

rigorosamente registradas e seguidas. O tempo de uso das lâmpadas de UV também deve ser registrado, já que elas possuem vida útil limitada. Deve-se trabalhar sempre perto de um bico de gás ou de lamparina acesa e usar uma máscara, para evitar aspiração de aerossol ou contaminar o ambiente com expiração, bem como lavar as mãos antes e depois da operação.

- **Balanças:** a balança de precisão é um dos equipamentos mais caros do laboratório, juntamente com a autoclave e a capela de fluxo laminar, e pouco acessível a pequenos laboratórios, apesar de imprescindível para pesagem de quantidades mínimas de fitorreguladores. Tem capacidade para pesar até 200 g e precisão de 0,1 mg. A balança analítica é utilizada para a pesagem de reagentes usados em maior quantidade. Em geral, tem capacidade para pesar até cerca de 4 kg e precisão de 0,1 g. O manuseio de uma balança requer muito cuidado, pois são instrumentos delicados, caros e que podem se desregular. Quando de sua utilização, devem ser observados os seguintes cuidados gerais:
  - Manter a balança limpa.
  - Não colocar os reagentes diretamente sobre o prato da balança.
  - Os objetos a serem pesados devem estar limpos, secos e à temperatura ambiente.
  - A balança deve ser mantida travada quando não estiver sendo utilizada.
  - As balanças analíticas devem estar travadas quando da retirada e colocação dos objetos a serem pesados.
  - Nas balanças analíticas, os objetos devem ser colocados e retirados com a pinça, e não com as mãos.
  - A balança deve ser recalibrada (informe o técnico do laboratório) sempre que mudada de local ou após longo período de uso.
  - O operador não deve se apoiar na mesa em que a balança está colocada.
- **Micropipetas:** devem ser usadas para medir quantidades muito pequenas de líquidos que funcionam pelo deslocamento de ar, mediante um êmbolo com deslocamento determinado, que, ao regressar ao ponto de origem, arrasta por sucção um volume



conhecido de líquido. Esse volume pode ser constante, em micropipetas de volume fixo, ou variável, nos modelos com volumes dentro de uma faixa determinada. As ponteiras para os mais diferentes modelos e marcas são, geralmente, transparentes (inferior a 2  $\mu\text{L}$  a 10  $\mu\text{L}$ ), amarelas (20  $\mu\text{L}$  a 200  $\mu\text{L}$ ) ou azuis (mais de 200  $\mu\text{L}$ ). As micropipetas são equipamentos sensíveis e dispendiosos, por isso recomenda-se o máximo de cuidado no seu manuseio e a realização de todas as operações lentamente. Quando de sua utilização, devem ser observados os seguintes cuidados gerais:

- Observar se a pipeta tem trava que evita alteração do volume marcado durante o uso. A pipeta deve estar destravada para que o volume desejado seja determinado.
- Nunca forçar os volumes das micropipetas para além ou aquém dos limites determinados pelo fabricante.
- Encaixar a ponteira com perfeição na pipeta antes do uso.
- A ponteira da micropipeta deve ser mergulhada no líquido com altura mínima que garanta o enchimento de forma constante, contínua e sem entrada de bolhas de ar. Observar o enchimento e, se necessário, pipetar novamente.
- As micropipetas devem ser manuseadas na vertical.
- Deve-se sempre mudar de ponteira quando pipetar um líquido diferente.
- Não pipetar líquidos a temperaturas superiores a 70 °C.
- O líquido nunca deve entrar no corpo da pipeta.
- Nunca virar a micropipeta ao contrário.
- Nunca colocar a pipeta de lado quando tiver líquido na ponteira.
- Nunca pipetar ácidos e bases fortes com as micropipetas.
- Para adicionar reagente a meios de cultura esterilizados, na câmara de fluxo, utilizar ponteiras autoclavadas que não tenham sido expostas ao ambiente fora da câmara de fluxo.

## **Segurança em laboratório**

A prática em laboratório, seja em nível profissional, seja em nível de aprendizado, exige que regras de segurança sejam rigorosamente

seguidas, para evitar acidentes e prejuízos de ordem humana ou material. Os acidentes podem, se tomadas as devidas precauções, ser evitados, ou ao menos ter suas conseqüências minimizadas.

A seguir, estão relacionadas algumas regras de segurança que devem ser colocadas em prática para a própria segurança e a de toda a equipe:

- Lavar as mãos com detergente antes do trabalho.
- O laboratório deve ser mantido sempre muito limpo – manter a porta do laboratório sempre fechada e evitar a formação de correntes de ar.
- A equipe deve usar sempre o guarda-pó (vestimenta) de algodão, de mangas compridas, na altura dos joelhos e fechado. Importante: ter cuidado com as mangas durante a manipulação de lâmparas.
- Usar calçados fechados de couro ou similar.
- Não usar relógios, pulseiras, anéis ou qualquer ornamento durante o trabalho no laboratório.
- Não beber e não comer no laboratório.
- Nunca usar material de laboratório para beber ou para comer.
- Nunca fumar no laboratório ou em qualquer outro lugar que possa pôr em risco a segurança ou a saúde das pessoas.
- Caminhar com atenção e nunca correr no laboratório.
- Não levar as mãos à boca ou aos olhos quando estiver manuseando produtos químicos.
- Aventais de laboratório, luvas, óculos de proteção ou outras vestimentas não devem ser usados fora do laboratório.
- Em caso de acidentes, manter a calma e chamar o técnico responsável.
- Objetos pessoais, como bolsas, blusas, etc., devem ser guardados em armários, de preferência em áreas externas aos laboratórios.
- Brincadeiras são absolutamente proibidas nos laboratórios.
- Usar a capela de exaustão sempre que trabalhar com solventes voláteis, tóxicos e reações perigosas, explosivas ou tóxicas.
- Substâncias inflamáveis devem ser manipuladas em locais distantes de fontes de aquecimento.

- O uso de pipetadores é requerido em qualquer circunstância ao utilizar pipetas.
- Nunca jogar reagentes ou resíduos de reações na pia; procurar o frasco de descarte.
- Ao final de cada utilização, as vidrarias usadas durante o trabalho de laboratório devem ser esvaziadas nos frascos de descarte e enxaguadas com água antes de ser enviadas para limpeza.
- O técnico responsável deve ser avisado sobre a ocorrência de vidrarias trincadas, lascadas ou quebradas, antes do descarte.
- Antes de manipular qualquer reagente, deve-se ter conhecimento de suas características com relação à toxicidade, à inflamabilidade e à explosividade.
- Deve-se tomar cuidados especiais quando manipular substâncias com potencial carcinogênico.
- Os reagentes e soluções devem ser claramente identificados; soluções devem apresentar data de preparo, validade e o nome do analista que as preparou.
- Em caso de acidente com reagentes, todo resíduo deve ser limpo assim que possível. No caso de ácidos e bases, estes devem ser neutralizados antes da limpeza. Se não tiver certeza de qual procedimento adotar para descontaminar o local do acidente, contatar o técnico ou o pesquisador responsável pelo laboratório.
- Seguir corretamente o procedimento padrão do laboratório, e não improvisar, pois improvisações podem causar acidentes; usar sempre materiais e equipamentos adequados.
- Todas as substâncias são tóxicas, dependendo de sua concentração. Nunca confiar no aspecto de uma droga, é necessário conhecer suas propriedades antes de manipulá-la.
- Receber visitas apenas fora do laboratório, pois elas não conhecem as normas de segurança e não estão adequadamente vestidas.

## **O meio de cultura**

O meio de cultura deve suprir tecidos e órgãos cultivados *in vitro* com nutrientes, visando a atender às condições do explante no seu crescimento. De acordo com Bown e Thorpe (1986), as composições química e física do meio são fatores determinantes para a iniciação e o desenvolvimento das culturas.

Basicamente, os meios consistem de uma mistura balanceada de macronutrientes e micronutrientes, carboidratos, fontes orgânicas de nitrogênio, vitaminas e reguladores de crescimento. Esses componentes são, muitas vezes, agrupados e preparados como soluções-estoque, várias vezes concentradas, das quais porções menores são tomadas quando da preparação do meio de cultura.

Os macronutrientes são fornecidos ao meio de cultura na forma de sais, contendo nitrogênio, potássio, fósforo, cálcio, enxofre e magnésio, que são requeridos em quantidades milimolares. São absorvidos pelas células vegetais como cátions ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  e  $\text{K}^{+}$ ); nitrogênio na forma de amônio ( $\text{NH}_4^{+}$ ) ou nitrato ( $\text{NO}_3^{-}$ ); fósforo como íons fosfato ( $\text{HPO}_4^{-2}$  e  $\text{H}_2\text{PO}_4^{-}$ ) e enxofre como íon sulfato ( $\text{SO}_4^{-2}$ ). A concentração ótima de cada nutriente, para alcançar taxas de crescimento máximas, varia consideravelmente dependendo da espécie, do tipo de cultura, etc.

Os elementos que são requeridos em concentrações micromolares são: ferro (Fe), manganês (Mn), zinco (Zn), boro (B), cobre (Cu), molibdênio (Mo), pelo que são denominados micronutrientes. Também é importante a incorporação de Cobalto (Co) e de Iodo (I) ao meio. Alguns meios de cultura usam os microelementos do meio B5 (GAMBORG et al., 1968) ou misturas mais concentradas nos meios MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e H (BOURGIN; NISCH, 1967).

Algumas células, tecidos e plântulas cultivados in vitro não encontram condições adequadas de iluminação e concentração de  $\text{CO}_2$  e, às vezes, não apresentam teores de clorofila suficientes para realizar fotossíntese que sustente o crescimento. Essas células e tecidos são heterotróficos e dependem de uma fonte externa de energia que deve ser incorporada ao meio de cultura: os carboidratos.

A fonte mais comum de carbono é a sacarose, que pode ser total ou parcialmente hidrolisada em glucose e frutose, com possibilidade de ser igualmente utilizadas em meios específicos. Outros carboidratos que têm sido igualmente testados incluem a lactose, a maltose, a galactose, e o amido, no entanto esses compostos são geralmente muito inferiores à sacarose ou à glucose como fonte de energia. A sacarose é normalmente usada em concentrações entre 2% – 3%.

As plantas, no seu ambiente natural, sintetizam as vitaminas que são necessárias para seu crescimento e para seu desenvolvimento. No entanto, quando células ou tecidos de plantas são colocados em cultura, algumas vitaminas podem ser limitantes para o crescimento *in vitro*. Esse crescimento e a sobrevivência podem ser aumentados pela adição, ao meio, de fatores em que células e tecidos vegetais se tornaram deficientes. As vitaminas mais freqüentemente usadas são: tiamina (vitamina B<sub>1</sub>), ácido nicotínico (niacina), piridoxina e vitamina B<sub>6</sub>, as quais fazem parte do meio MS e são adicionadas em diferentes concentrações. Alguns meios também contêm pantotenato de cálcio e biotina, mas essas e outras vitaminas (riboflavina, ácido ascórbico, ácido fólico), que podem ser adicionadas, não são consideradas fatores que limitam o crescimento.

O mio-inositol, um hexitol ou composto cíclico com grupos OH em todos os seus seis carbonos, é considerado estimulador de processos de crescimento *in vitro* e pode servir como fonte de carboidrato.

Os aminoácidos podem ser adicionados ao meio para satisfazer a necessidade das culturas quando o nitrogênio é reduzido, e a suplementação pode ser realizada pela inclusão de uma proteína hidrolisada ao meio. Os aminoácidos e amidas têm importância na amplificação das respostas morfogênicas, os quais proporcionam maior crescimento e facilitam a diferenciação no sentido da regeneração. A tirosina apresenta influência na iniciação de parte aérea em cultura de calos, L-arginina no enraizamento e L-serina na obtenção de embriões haplóides mediante o cultivo de micrósporo. As amidas L-glutamina e L-asparagina são benéficas na obtenção de embriões somáticos, e a cisteína é incluída, às vezes, como agente redutor.

Substâncias complexas são preparações obtidas de produtos naturais, de composições indefinidas, que servem para enriquecer o meio de cultivo. A composição desses produtos é de difícil determinação e de uso restrito a algumas culturas e de complicada repetição experimental. Uma grande variedade de extratos foi bastante utilizada, entre eles hidrolisados de proteínas, extratos de leveduras, assim como preparados vegetais, tais como polpa de banana, suco de laranja e de tomate. De todos, a água de coco é o aditivo mais utilizado para um grande número de espécies *in vitro*, freqüentemente a 2% – 15% (v/v). As substâncias obtidas de tecidos vegetais podem conter componentes que são reguladores de crescimento.

Os meios nutritivos podem ser utilizados na forma semi-sólida ou líquida. Nos meios semi-sólidos, a substância com ação geleificante freqüentemente utilizada é o ágar, um polissacarídeo extraído de algas marinhas que dá consistência ao meio e serve de suporte às plantas. Outros produtos têm sido testados e/ou utilizados, tais como fitagel, agarose, amido, entre outros.

Os reguladores de crescimento são fatores determinantes, no crescimento e no padrão de desenvolvimento, na maioria dos sistemas de cultura de tecidos. As auxinas, as citocininas e as giberelinas são os grupos de reguladores de crescimento mais freqüentemente utilizados. A ação das auxinas é verificada na indução do alongamento celular e na diferenciação de raízes em culturas *in vitro*, entre muitas outras ações como: indução de embriogênese, aumento da friabilidade de calos, alongamento de entrenós, etc. As citocininas constituem o grupo de reguladores indispensáveis à divisão celular, à quebra de dominância apical, à indução e proliferação de gemas axilares e diferenciação de gemas adventícias, à indução de parte aérea em calos. Dentre as diversas giberelinas, o GA<sub>3</sub> é o mais freqüentemente utilizado, e tem efeito relacionado à estimulação do crescimento de órgãos, como o alongamento de caule e de raízes, assim como ao desenvolvimento de embriões somáticos e ao florescimento. De outros grupos de reguladores, também se aplicam o ácido abscísico, como inibidor de crescimento e indutor da maturação de embriões, e o etileno, regulador produzido pela própria planta, na forma gasosa. Para leitura um pouco mais completa das ações dos reguladores de crescimento, deve-se consultar a literatura especializada e lembrar que, na maioria das situações, é necessário que ocorra um equilíbrio entre os reguladores fornecidos no meio de cultura e, ainda, entre estes e os reguladores endógenos dos explantes, para que a rota de desenvolvimento pretendida para os experimentos seja alcançada.

Além dos componentes básicos, outras substâncias podem ser incorporadas aos meios de cultura com fins específicos, conforme relacionados abaixo:

- Fungicidas e antibióticos para o controle da contaminação.
- A adenina, utilizada na forma de sulfato de adenina, pode ter o efeito de uma citocinina fraca ou interagir com as citocininas do meio.
- Carvão ativado, utilizado para a adsorção de impurezas e substâncias tóxicas, como os fenóis, e para a redução dos efeitos residuais das citocininas, além de utilizado para estimular o enraizamento e a maturação de embriões somáticos.

- Outros antioxidantes como PVP e ácido ascórbico.

Vários meios de cultura têm sido testados e identificados pela composição em sais minerais. As vitaminas, reguladores e outros suplementos orgânicos variam amplamente, com respeito a sua composição e concentração. A escolha do meio de cultura depende da espécie em questão e do propósito da cultura.

- O meio White (1951) foi utilizado durante anos como meio básico para a cultura de grande variedade de tecidos de diferentes espécies. A mudança de padrão, ao longo de anos após seu estabelecimento, seguiu as tentativas de otimizar o crescimento de calos *in vitro*.
- O meio MS (Murashige e Skoog, 1962) é universalmente usado, especialmente para morfogênese, cultura de meristemas e regeneração de plantas, e caracteriza-se pela elevada concentração de sais minerais.
- O meio B5 foi desenvolvido por Gamborg et al. (1968) e contém quantidades mais baixas de sais minerais, o que parece ser preferido pelas células de determinadas espécies.
- O meio SH (Schenk e Hildebrandt, 1972) tem concentrações iônicas finais semelhantes às de Gamborg et al. (1968), porém com níveis mais altos de  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  e  $\text{H}_2\text{PO}_4$ , e é mais comumente utilizado na cultura de leguminosas.
- O meio Anderson (1978, 1980) tem sido recomendado para lenhosas e apresenta 1/4 das concentrações de íon de nitrato, amônia e potássio do meio MS e o dobro de níveis de  $\text{PO}^{-3}$ .
- O meio WPM - Wood Plant Medium (Lloyd e Mc Cown, 1981) é amplamente utilizado para propagação de arbustos e árvores, em laboratórios comerciais. Apresenta as mesmas concentrações de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  que o meio Anderson, além de mais potássio e alto nível de íons sulfato.

As composições dos meios citados acima, utilizados em cultura de tecidos, estão relacionadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Composição básica dos principais meios de cultura.

Componente	B5 <sup>a</sup>	H	LS	MS	White*	WPM	SH
mg L <sup>-1</sup>							
<b>Macronutrientes</b>							
CaCl <sub>2</sub>	-	166,0	-	-	-	-	-
CaCl <sub>2</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	150,0	-	440,0	440,0	-	96,0	200,0
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	300,0	556,0	-
KCl	-	-	-	-	65,0	-	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	68,0	170,0	170,0	-	170,0	-
KNO <sub>3</sub>	2.500,0	950,0	1900,0	1900,0	80,0	-	2.500,0
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	990,0	-
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	250,0	185,0	370,0	370,0	720,0	370,0	400,0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	150,0	-	-	-	19,0	-	-
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	-	200,0	-	-
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	-	720,0	1650,0	1650,0	-	400,0	-
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	-	300,0
(Nh <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134,0	-	-	-	-	-	-
<b>Micronutrientes</b>							
CoCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	0,025	-	0,025	0,025	-	-	0,1
CuSO <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	-	-
CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025	0,025	0,001	0,25	0,2
Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	-	-	-	-	2,5	-	-
Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	3,0	10,0	6,2	6,2	1,5	6,2	5,0
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,75	-	0,83	0,83	0,75	-	1,0
KI	13,2	-	-	22,3	5,0	22,3	13,2
MnSO <sub>4</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	1,25	-	-
HI <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .HI <sub>2</sub> O	0,25	0,25	0,25	0,25	-	0,25	0,1
NaI <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2 H <sub>2</sub> O	2,0	10,0	8,6	8,6	3,0	8,6	1,0
ZnSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	27,8**	27,8	27,8	27,8	-	27,8	15,0
Fe(SO <sub>4</sub> ) . 7 H <sub>2</sub> O	37,2**	37,2	37,2	37,2	-	37,2	20,0
Na <sub>2</sub> EDTA . 2 H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	-	-	-
<b>Orgânicos</b>							
Ácido fólico	-	0,5	-	-	-	-	-
Ácido indol acético	-	0,1	-	-	-	-	-
Ácido indol acético	1,0	5,0	-	0,5	-	-	5,0
Ácido nicotínico	-	0,05	-	-	-	-	-
Biotina	-	2,0	-	2,0 <sup>f</sup>	-	-	-
Glicina	100***	100	100	100	-	-	1000
Mio-inositol	1,0***	0,5	-	0,5	-	-	0,5
Piridoxina.hcl	10,0***	0,5	0,4	0,1	-	1,0 <sup>b</sup>	5,0
Tiamina.hcl	-	-	-	-	-	-	-

\* White (1963), <sup>b</sup> White (1937).

\*\* Originalmente 28 mg/L de FeDTPA.

\*\*\* Gamborg (1977) incluiu 1,3 mg L<sup>-1</sup> de nicotinamida; <sup>a</sup> Gamborg (1968); <sup>f</sup> Murashige e Skoog (1962) suplementado também incluiu 1g L<sup>-1</sup> de hidrolisado protéico.



## **Preparo do meio de cultura**

Para cada fase de desenvolvimento da cultura in vitro, as formulações ou dosagens dos meios variam conforme as necessidades da espécie cultivada. Esses meios se baseiam nas exigências nutricionais das plantas, com algumas modificações, para atender às necessidades específicas in vitro.

O preparo do meio de cultura é uma das etapas que mais demandam tempo, portanto, com o propósito de otimizar a rotina no laboratório, é conveniente e prático armazenar os componentes do meio em soluções-estoque concentradas. Tendo-se as soluções-estoque de sais, vitaminas e reguladores de crescimento prontas, o preparo de meios de cultura torna-se bastante rápido.

Cada laboratório pode adotar diferentes procedimentos para preparo dos meios nutritivos; entretanto, deve-se tomar cuidado quando do preparo, pois determinados sais não podem ser misturados em uma mesma solução.

Todas as soluções devem ser preparadas com água destilada e deionizada, sempre observando as exigências de solubilidade e armazenamento da substância química. A água da torneira não é adequada para o preparo de soluções-estoque e meios de cultura, dada a possibilidade de impurezas nela contidas, como cátions (amônio, cálcio, ferro, magnésio, sódio, potássio), ânions (bicarbonato, nitrato, sulfato e fosfato), matéria orgânica, sílica, metais, microrganismos e gases (amônia).

Deve-se prestar atenção à fórmula química exata dos reagentes que estão sendo utilizados para fazer as soluções, verificando sempre se está pesando exatamente o mesmo reagente descrito nas tabelas, além de conferir os pesos moleculares (MW ou FW em rótulos na língua inglesa).

A Tabela 2 apresenta as quantidades de sais minerais utilizadas para o preparo das soluções-estoque do meio MS aplicado no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental, no qual a concentração das soluções-estoque é expressa em g L<sup>-1</sup>, e preparado numa concentração 100 vezes maior que a concentração final. As soluções devem ser armazenadas em frascos escuros e em geladeira.

**Tabela 2.** Relação e concentração das soluções-estoque do meio de cultura MS.

Solução-estoque	Componente	Concentração
<b>Macronutrientes</b>		g L <sup>-1</sup>
A	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	165,0
B	KNO <sub>3</sub>	190,0
C	CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	44,0
D	MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	37,0
E	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17,0
<b>Micronutrientes</b>		
F	MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	1,690
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,620
	ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,860
	KI	0,083
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,025
	CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0,0025
	CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,0025
<b>Fe.EDTA</b>		
G	Fe.EDTA	
	Na <sub>2</sub> EDTA . 2 H <sub>2</sub> O	3,73
	FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	2,78
<b>Misturas orgânicas</b>		
H	tiamina . HCl	0,01
	ácido nicotínico	0,05
	piridoxina . HCl	0,05
I	glicina	0,2
J	mio-inositol	10,0

Os estoques de macronutrientes (A, B, C, D e E) devem ser dissolvidos em 500 mL de água destilada e deionizada cada. Em seguida, completar os respectivos volumes para 1.000 mL e agitar bem. Armazenar em frascos na geladeira.

O estoque de micronutrientes (F) é preparado dissolvendo-se cada um dos micronutrientes, um após o outro, em 300 mL de água destilada e deionizada, completando o volume para 1.000 mL, seguido de agitação. O preparado deve ser colocado em frasco e armazenado em geladeira.

O estoque (G) (Fe.EDTA) é preparado com a diluição de  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  em 800 mL de água destilada e deionizada morna. Após dissolução, manter a agitação e adicionar lentamente o  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Após dissolução, completar o volume para 1.000 mL e agitar novamente. Colocar em frasco escuro, coberto com papel alumínio, e armazenar em geladeira.

Dessa forma, para o preparo de 1.000 mL de meio MS, deve-se usar 10 mL de cada solução-estoque.

Para as vitaminas, também são preparadas soluções-estoque e, nesses casos, por tratar-se de soluções orgânicas, recomenda-se preparo em frascos menores ou estocagem em *freezer*, a fim de dificultar o desenvolvimento de microrganismos. O estoque (H) é preparado dissolvendo-se os três componentes em 300 mL de água destilada e deionizada e, em seguida, completando o volume para 1.000 mL, agitando bem e armazenando em frasco na geladeira. Da mesma maneira são preparadas as soluções I e J.

No caso de reguladores de crescimento, deve-se ficar atento à solubilidade do produto. As soluções são preparadas pesando-se a quantidade devida, que é dissolvida com posterior adição de água. Os reguladores de crescimento são mais exigentes que as vitaminas, com relação à solubilidade. As soluções devem ser armazenadas em *freezer*, em frascos pequenos, para evitar congelar e descongelar a mesma solução várias vezes.

Quase todos os reguladores são relativamente solúveis em água. Recomenda-se dissolver as auxinas (ácidos orgânicos) em base na proporção de 3 gotas da base para cada 10 mg da auxina e água. As citocininas (bases orgânicas) devem ser dissolvidas em ácido na mesma proporção usada para as auxinas. No entanto, as citocininas se dissolvem em base com certa facilidade. Gamborg (1984) recomenda o uso do álcool etílico para a dissolução dos reguladores de crescimento. Cuidados devem ser observados no uso de álcool, pois este é inibidor da embriogênese in vitro. Os reguladores podem ser preparados em soluções concentradas, para que pequenas quantidades sejam adicionadas ao meio sem alterar as outras características.

Na Tabela 3 são detalhadas as características de vários reguladores de crescimento.

**Tabela 3.** Características, fatores de conversão e solventes de alguns reguladores de crescimento.

Regulador	Peso molecular	Esterilização	Conversão		Solvente	Armazenamento em °C*
			mg/L em $\mu\text{mol/L}$	$\mu\text{mol/L}$ em mg/L		
<b>Auxinas</b>						
AIA	175,2	filragem	5,71	0,175	gotas de NaOH 1M ou etanol ou KOH 1M	0°
AIB	203,2	autoclave	4,92	0,203	gotas de NaOH 1M	5°
ANA	186,2	autoclave	5,37	0,186	gotas de NaOH 1M	ambiente
2,4-D	221,0	autoclave	4,53	0,221	gotas de NaOH 1M ou etanol	ambiente
Picloram	241,5	autoclave			água	
<b>Citocininas</b>						
KIN	215,2	autoclave	4,65	0,215	gotas de HCl 1M	0°
BAP	225,3	autoclave	4,44	0,225	gotas de HCl 1M	ambiente
2-ip	203,2		4,92	0,203	gotas de HCl 1M	0°
Z	219,2	filragem	4,56	0,219	gotas de HCl 1M	0°
TDZ	220,2	autoclave	4,54	0,220	álcool 70% ou DMSO	0°
<b>Outros</b>						
GA <sub>3</sub>	346,4	filragem	2,89	0,346	etanol 50% ou NaOH	ambiente
ABA	264,3	filragem	3,78	0,264	água + gotas de HCl 1	-20°

2,4-D = diclofenoxicético; AIA = ácido indolil-3-acético; AIB = ácido indolil-3-butírico; ANA = ácido alfa-naftaleno acético. Citocinina = BAP (BA) = benzilamino purina; KIN = cinetina; TDZ = thidiazuron; 2-ip = N<sup>6</sup> 2-isopenteniladenina; Z = zeatina. (Outros: GA<sub>3</sub> = ácido giberelico; ABA = ácido abscísico. \* Armazenamento do reagente sólido. Verifique sempre no rótulo dos frascos qual é a temperatura de armazenamento de tudo que estiver utilizando.

Os reguladores de crescimento que são termolábeis devem ser esterilizados por ultrafiltração. Esse processo é mais lento e mais caro que a autoclavagem, mas garante a integridade dos reguladores no meio de cultura. As soluções a ser esterilizadas são passadas por um filtro com tamanho de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  de diâmetro em um recipiente esterilizado. Pequenos volumes de soluções (10 mL ou 20 mL) devem ser passados através de uma unidade de filtro com adaptador para seringa preso a uma desta e estocados. Depois de calculada a quantidade necessária para o preparo do meio, a solução-estoque filtrada pode ser adicionada ao meio autoclavado que foi deixado resfriar, até atingir aproximadamente 45 °C, utilizando-se micropipeta com ponteiros autoclavadas dentro da câmara de fluxo.

Grandes volumes de solução, como a esterilização de açúcares, necessitam ser passados por um filtro de diâmetro maior, sob pressão ou vácuo em vidrarias autoclavadas.

Tendo-se as soluções-estoque de sais, vitaminas e reguladores de crescimento prontas, o preparo de meios de cultura torna-se bastante rápido. Antes de preparar o meio, deve-se calcular a quantidade necessária de cada solução para o preparo do volume de meio de cultura desejado, anotar os valores em formulário próprio, o qual serve como roteiro de trabalho. Também devem ser anotadas, nesse roteiro, as quantidades a ser adicionadas de sacarose, vitaminas, reguladores de crescimento e o agente solidificante. O volume de cada solução deve ser retirado com pipeta, para maior precisão, utilizando-se sempre uma pipeta para cada frasco, a fim de evitar contaminação das soluções.

Esse preparo pode ser realizado adotando-se diferentes formas de procedimentos. A seguir são descritos dois métodos.

### **Passos para o preparo do meio – Método 1**

- Primeiramente ligar o peagâmetro (pHmetro) meia hora antes do uso, e somente depois desse período calibrá-lo com soluções padrões.
- Definida a quantidade de meio a ser preparada, preencher o formulário de meio de cultura. Exemplo: para fazer 1.000 mL de meio (1 L), inicialmente aferir o volume a ser preparado, marcando-se, no Becker, o volume final, no caso 1 L de água estéril.
- Transferir aproximadamente 700 mL (seguindo o exemplo) para outro recipiente, para utilizar ao final.
- Nos aproximados 300 mL de água destilada deionizada que restarem no Becker, adicionar as soluções-estoque, considerando a concentração adotada no laboratório; no caso do Laboratório da Embrapa Amazônia Ocidental, tomar 10 mL por litro de meio a ser preparado.
- Adicionar a sacarose já pesada e levar a solução ao pHmetro.
- No pHmetro já calibrado, ajustar o pH com auxílio de micropipeta e soluções próprias, sempre sob agitação. O pH final deve ser entre 5,6-5,8 ou conforme solicitado.
- Pesar o ágar e acrescentá-lo à solução, assim como a maior porção da água reservada inicialmente.
- Levar a solução ao microondas em potência alta por aproximadamente 7 minutos, agitando no tempo intermediário. Esse meio ficará pronto quando estiver transparente, começando a ferver. Cuidar para não formar grumos. Ao final do tempo no microondas, retirar e completar

o volume pré-estabelecido (no exemplo, 1.000 mL) com água morna. Distribuir nos frascos, vedar muito bem com papel alumínio e levar para a autoclave a 120 °C, por 15–20 minutos.

### **Passos para o preparo do meio – Método 2**

- Primeiramente ligar o pHmetro meia hora antes do uso, e somente depois desse período calibrá-lo com soluções padrões.
- Definida a quantidade de meio a ser preparado, preencher o formulário de meio de cultura.
- Pesquisar a quantidade necessária de ágar e sacarose.
- Colocar 40% do volume de água deionizada em recipiente apropriado ao volume final a ser preparado. Pipetar as soluções-estoques e dissolver a sacarose. Completar com água a metade do volume final.
- Ajustar o pH com auxílio de micropipeta e soluções próprias, sempre sob agitação. O pH final deve ser de 5,8.
- Em outro recipiente, colocar o ágar e a outra metade do volume final (água) e dissolver em microondas em potência alta, agitando de vez em quando. Esse meio ficará pronto quando estiver transparente, começando a ferver.
- Misturar as partes, distribuir nos tubos ou frascos e vedar bem com papel alumínio ou tampa plástica e levar para a autoclave a 121 °C, por 20 minutos.

### **Lembretes gerais**

- Os químicos são dissolvidos em água destilada. Os sais devem ser sempre dissolvidos pela adição, um por vez. A precipitação é normalmente evitada pela dissolução de fontes de nitrogênio inorgânico primeiro. A precipitação pode ocorrer entre as fontes de fosfato ou de cálcio, quando o pH for aproximado a 6,0. Depois da dissolução dos sais e de outros ingredientes, o pH é ajustado.
- As soluções-estoque dos reguladores de crescimento podem ser preparadas nas concentrações de 1 mg/L. Observe a quantidade (g) do reagente que vai pesar, antes de iniciar o preparo de meio. Alguns reguladores são adquiridos em pequeníssimas quantidades. Em caso de dúvidas, procure o responsável pelo Laboratório.

- Observar, com frequência, o funcionamento do pHmetro, o *timer* da sala de crescimento e a condutividade elétrica da água utilizada no laboratório.
- A limpeza do laboratório deve ser realizada diariamente, e semanalmente, com água sanitária e desinfetante, principalmente na sala de crescimento.

## Cálculos

A seguir são colocados alguns conceitos químicos, transformações e principais cálculos matemáticos aplicados nas rotinas do laboratório, os quais são necessários antes do preparo de soluções e meios de cultura.

- Solução molar (M) = 1 mol (corresponde ao peso molecular em gramas) de uma substância em 1 litro de solução.
- Solução milimolar (mM) =  $1/1.000 = 0,001$  de um mol (mmol) de uma substância em 1 litro de solução = 0,001 M.
- Solução micromolar ( $\mu\text{M}$ ) =  $1/1.000.000 = 0,000001$  de um mol (mol) de uma substância em 1 litro de solução = 0,000 001 M.
- Normal (N) = 1 equivalente grama de uma substância em 1 litro de solução.
- ppm =  $\text{mg L}^{-1}$ ;  $\text{g mL}^{-1}$ .
- Molaridade (M): indica o número de moléculas da substância em um volume da solução. Uma solução molar é preparada pesando-se um mol (peso molecular) da substância, o qual é dissolvido num solvente, de modo a se obter 1 litro da solução.

Ex. Preparo de uma solução 1 M ou mol/L de  $\text{KNO}_3$

$$\text{PM}_{\text{KNO}_3} = 101,10 \text{ g}$$

Pesar 101,10 g e completar o volume com água destilada e deionizada, para 1000 mL.

- Porcentagem (%): indica qual a porcentagem do volume total que corresponde ao soluto.

Ex. Preparo de 100 mL de uma solução 2% de sacarose.

Pesar 2 g de sacarose.

Completar o volume, com água destilada e deionizada, para 100 mL.

- Peso por volume (p/v): indica qual o peso do soluto presente no volume de solução.

Ex 1. Preparo de 1.000 mL de uma solução com 101,10 g de  $\text{KNO}_3$ .

Pesar 101,10 g de  $\text{KNO}_3$ .

Completar o volume com água destilada e deionizada, para 1.000 mL.

Ex. 2. Preparo de 1.000 mL de  $\text{KNO}_3$  10 % p/v ou 10:1.000 p/v.

Pesar 10 g de nitrato de potássio e fazer solução em 1 litro

- Volume por volume (v/v).
  - Ex. 1. Preparo de Tween 2% (v/v).
    - Pipetar 2 mL de Tween e completar a solução para 100 mL.
- Parte por milhão (ppm): indica uma solução com a presença de 1 mg de soluto em 1.000 mL da solução, ou 1 g em 1 mL, e assim por diante.
- Adição de reguladores de crescimento: a aplicação pode ser feita diretamente ao meio de cultura pela pesagem e diluição em solvente apropriado ou utilizando-se volume de solução-estoque previamente preparada. Nesse último caso, basta calcular a quantidade de volume a ser retirado na solução e acrescentar ao meio. Esse volume deve ser determinado por meio da seguinte fórmula:

$$V_A \times C_A = V_B \times C_B$$

**Onde:**  $V_A$  é o volume da solução-estoque a ser tomado.

$C_A$  é a concentração da solução-estoque.

$V_B$  é o volume de meio a ser preparado.

$C_B$  é a concentração desejada no meio a ser preparado.

**Exemplo:** Uma solução-estoque de BAP tem concentração de 10 mg/100 mL e deseja-se preparar 1.000 mL de meio de cultura contendo 0,5 mg/L de BAP. Para tal, deve-se determinar o  $V_A$  aplicando  $V_A \times C_A = V_B \times C_B$ , onde tem-se:

$$V_A \times 100 \text{ mg/L} = 0,5 \text{ mg/L} \times 1.000 \text{ mL.}$$

$$V_A = 0,5 \times 1.000 / 100.$$

$V_A = 5$  mL da solução-estoque, para preparar 1 litro do meio de cultura

Sempre observar se as unidades aplicadas na fórmula são as mesmas, caso contrário estas devem ser uniformizadas.



## Referências

- AMMIRATO, P. V. **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan, 1990. v. 5.
- BAJAJ, Y. P. S. **Biotechnology in agriculture and forestry 19: high-tech and micropropagation plant III**. Berlin: Springer-Verlag, 1992.
- BARROS, I. C. et al. **Recomendações referentes a segurança nos laboratórios da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 36 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 101).
- BROWN, D.C.W.; THORPE, T.A. **Plant regeneration by organogenesis**. In: VASIL, I. K. (Ed.). *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. Orlando: Academic, 1986. v.3, p.49-73.
- BOURGIN, J. P.; NITSCH, J. P. Production of haploid Nicotiana from excised stamens. **Annales de Physiologie Vegetale**, v. 9, p. 377-382, 1967.
- 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, DF: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPH, 1998. p. 87-132.

CARNEIRO, V. T. C. de et al. Protoplastos: cultura e aplicações. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPH, 1998. p. 413- 458.

CID, L. P. B. A propagação *in vitro* de plantas. **O que é isso? Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 19, p. 16-21, 2001.

FERNANDES, M. I. B. M. de. Obtenção de plantas haplóides através da cultura de anteras. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicação da cultura de tecidos de planta**. Brasília, DF: ABCTP/EMBRAPA/CNPH, 1990. p. 311-332.

GAMBORG, O.; MILLER, R.; OJIMA, K. Nutrient requirement suspensions cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, n. 1, p. 151-158, 1968.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Basingstoke: Edington, 1996.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de planta**. Brasília, DF: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p. 99-169.

KERBAUY, G. B. Morfogênese: competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de planta**. Brasília, DF: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p. 519-532.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendro* spp. **HortScience**, v. 15, n. 3, p. 416, 1981 (Abst.321).

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

PASQUAL, M. et al. **Cultura de tecidos: tecnologia e aplicações: aplicações no melhoramento genético de plantas**. Lavras: [s.n.], 1997.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Mundiprensa, 1988.

ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991. 543 p.

SCHENK, R. O.; HILDEBRANDT, A. C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous plant cell cultures. **Canadian Journal of Botany**, v. 50, p. 199-204, 1972.

THORPE, T. A. Organogenesis in vitro: structural, physiological, and biochemical aspects. In: VASIL, I. K. (Ed.). **Perspectives in plant cell and tissue culture**. New York: Academic Press, 1980. p. 71-111.

WHITE, P. R. Survival of isolated tomato roots at sub-optimal and supra-optimal temperatures. **Plant Physiology**, v. 12, p. 771-776, 1937.

WHITE, P. R. Nutritional requirements of isolated plant tissues and organs. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 2, p. 231-244, 1951.

WHITE, P. R. **The cultivation of plant and animal cells**. New York: Ronald, 1963.

## Anexos

**Tabela 4.** Características e armazenamento de sais minerais e vitaminas utilizados nos meios de cultura.

Compostos inorgânicos	PM	Solvente	Esterilização	Armazenagem
Ácido bórico	61,8	água	autoclave	ambiente
Cloreto de cálcio anidro	110,9	água	autoclave	ambiente
Cloreto de cálcio dihidratado	147,0	água	autoclave	ambiente
Cloreto de cobalto	237,9	água	autoclave	ambiente
Cloreto de níquel	237,7	água	autoclave	ambiente
Cloreto de sódio	58,4	água	autoclave	ambiente
EDTA dissódico	372,2	água	autoclave	ambiente
Fosfato de K monobásico	136,1	água	autoclave	ambiente
Iodeto de potássio	166,0	água	autoclave	ambiente
Molibdato de sódio	241,9	água	autoclave	ambiente
Nitrato de amônio	80,0	água	autoclave	ambiente
Nitrato de cálcio	236,2	água	autoclave	ambiente
Nitrato de potássio	101,1	água	autoclave	ambiente
Sulfato de amônio	132,1	água	autoclave	ambiente
Sulfato de cobre	249,7	água	autoclave	ambiente
Sulfato de magnésio	246,5	água	autoclave	ambiente
Sulfato de manganês monohid.	169,0	água	autoclave	ambiente
Sulfato de manganês tetrahidr.	223,0	água	autoclave	ambiente
Sulfato de potássio	174,3	água	autoclave	ambiente
Sulfato de zinco	287,5	água	autoclave	ambiente
Sulfato férrico	372,3	água	autoclave	ambiente
Sulfato ferroso	278,0	água	autoclave	ambiente
Compostos orgânicos	PM	Solvente	Esterilização	Armazenagem
Ácido ascórbico	176,1	água	filtragem	- 0 °C
Ácido cítrico	192,1	água	autoclave	- 0 °C
Ácido fólico	441,4	NaOH 1mol/L	filtragem	- 0 °C
Ácido nicotínico	123,1	água	autoclave	- 0 °C
Adenina	135,10	água	autoclave	
Biotina	244,3	NaOH 1mol/L	autoclave	- 0 °C
Glicina	75,07	água	autoclave	
Inositol	180,16	água	autoclave	
Pantotenato de cálcio	476,5	água	autoclave	- 0 °C
Piridoxina.HCl	205,6	água	autoclave	- 0 °C
Riboflavina	376,4	NaOH		- 0 °C
Sacarose	342,30	água	autoclave	ambiente
Tiamina.HCl	337,3	água	autoclave	- 0 °C

\*Armazenamento do reagente sólido. Verifique sempre, no rótulo dos frascos, qual é a temperatura de armazenamento de tudo que estiver utilizando.

**Tabela 5.** Determinação do volume a ser aliquotado (em mL) a partir de solução-estoque de regulador de crescimento de 1 mg/1 mL\*.

Volume a ser preparado (mL)	Concentração desejada em mg/L										
	0,01	0,1	0,5	1,0	2	2,5	3	4	5	7,5	10
100	0,001	0,010	0,050	0,100	0,200	0,250	0,300	0,400	0,500	0,750	1,000
150	0,002	0,015	0,075	0,150	0,300	0,375	0,450	0,600	0,500	1,125	1,500
200	0,002	0,020	0,100	0,200	0,400	0,500	0,600	0,800	0,500	1,500	2,000
250	0,003	0,025	0,125	0,250	0,500	0,625	0,750	1,000	0,500	1,875	2,500
300	0,003	0,030	0,150	0,300	0,600	0,750	0,900	1,200	0,500	2,250	3,000
350	0,004	0,035	0,175	0,350	0,700	0,875	1,050	1,400	0,500	2,625	3,500
400	0,004	0,040	0,200	0,400	0,800	1,000	1,200	1,600	0,500	3,000	4,000
450	0,005	0,045	0,225	0,450	0,900	1,125	1,350	1,800	0,500	3,375	4,500
500	0,005	0,050	0,250	0,500	1,000	1,250	1,500	2,000	0,500	3,750	5,000
550	0,006	0,055	0,275	0,550	1,100	1,375	1,650	2,200	0,500	4,125	5,500
600	0,006	0,060	0,300	0,600	1,200	1,500	1,800	2,400	0,500	4,500	6,000
650	0,007	0,065	0,325	0,650	1,300	1,625	1,950	2,600	0,500	4,875	6,500
700	0,007	0,070	0,350	0,700	1,400	1,750	2,100	2,800	0,500	5,250	7,000
750	0,008	0,075	0,375	0,750	1,500	1,875	2,250	3,000	0,500	5,625	7,500
800	0,008	0,080	0,400	0,800	1,600	2,000	2,400	3,200	0,500	6,000	8,000
850	0,009	0,085	0,425	0,850	1,700	2,125	2,550	3,400	0,500	6,375	8,500
900	0,009	0,090	0,450	0,900	1,800	2,250	2,700	3,600	0,500	6,750	9,000
950	0,010	0,095	0,475	0,950	1,900	2,375	2,850	3,800	0,500	7,125	9,500
1.000	0,010	0,100	0,500	1,000	2,000	2,500	3,000	4,000	0,500	7,500	10,000

\*Para preparar 20 mL dessa solução-estoque, é necessário pesar 20 mg de reagente, por exemplo. Verifique sempre se a quantidade do reagente é suficiente para preparar o volume que pretende. Muita atenção! Alguns reguladores são vendidos em quantidades pequeníssimas e são muito caros. Em dúvida, pergunte ao responsável pelo Laboratório.

**Tabela 6.** Valores de concentrações e equivalências matemáticas.

	%	ppb	g/L (p/v)	ppm
1:100	1	10	10000	
1:200	0.5	5	50000	
1:500	0.2	2	2000	
1:1000	0.1	1	1000	
1:2000	0.05	0.5	500	
1:5000	0.02	0.2	200	
1:10000	0.01	0.1	100	
1:20000	0.005	0.05	50	
1:50000	0.002	0.02	20	
1:100000	0.001	0.01	10	10000
1:200000	0.0005	0.005	5	5000
1:500000	0.0002	0.002	2	2000
1:1 milhão	0.0001	0.001	1	1000
1:2 milhões	0.00005	0.0005	0.5	500
1:5 milhões	0.00002	0.0002	0.2	200
1:10 milhões	0.00001	0.0001	0.1	100
1:20 milhões	0.000005	0.00005	0.05	50
1:50 milhões	0.000002	0.00002	0.02	20
1:100 milhões	0.000001	0.00001	0.01	10
1:200 milhões	0.0000005	0.000005	0.005	5
1:500 milhões	0.0000002	0.000002	0.002	2
1:1 bilhão	0.0000001	0.000001	0.001	1

**Tabela 7.** Grau de perda de compostos freqüentemente utilizados para cultura de tecidos vegetais por meio de aquecimento do meio de cultura.

Composto	Grau de degradação
ABA	algum
frutose	substância inibitória
ácido giberélico	leve
L-glutamina	alto
AIA	40% perda em 20' autoclave
AIB	20% perda em 20' autoclave
cinetina	leve
extrato de malte	substância inibitória
PBA	leve
piridoxina	leve
2-iP	leve
tiamina	alto em pH < 5,5
Zeatina	leve



**Embrapa**

---

*Amazônia Ocidental*

**Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento**

